

Aus der Klinik für Kleintiere
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Untersuchungen zur Eignung von Viromeren als neuartige Trägersysteme
für die genbasierte Behandlung von Entzündungserkrankungen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Edith Elisabeth Jansig
aus Weimar

Leipzig, 2020

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Dr. Thomas Vahlenkamp

Betreuer: Prof. Dr. med. vet. Romy M. Heilmann
Prof. Dr. Hans-Ulrich Demuth

Gutachter: Prof. Dr. med. vet. Romy M. Heilmann
Klinik für Kleintiere, Veterinärmedizinische Fakultät
Universität Leipzig

Prof. Dr. Hans-Ulrich Demuth
Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie, Molekulare
Wirkstoffbiochemie und Therapieentwicklung Halle (Saale)

Prof. Dr. med. Stephan von Hörsten
Abteilung Experimentelle Therapie
Universitätsklinikum Erlangen

Tag der Verteidigung: 17.12.2019

Meinem Bruder

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	XI
1 Einleitung und Fragestellung.....	1
2 Literaturübersicht.....	2
2.1 Entzündungen	2
2.2 Pathophysiologie von Entzündungsprozessen - Übersicht.....	2
2.3 Monozyten	3
2.3.1 Zytokine	5
2.3.2 CC-Chemokinligand-2 (CCL2).....	6
2.3.3 Tumornekrosefaktor- α (TNF- α).....	8
2.4 Somatische Gentherapie.....	10
2.4.1 Methoden des Gentransfers.....	12
2.4.2 Nicht-virale Trägermaterialien.....	13
2.4.2.1 Liposomen.....	14
2.4.2.2 Polyethylenimin (PEI).....	15
2.5 Viromer.....	16
2.5.1 Aufbau.....	16
2.6 Beeinflussung von Entzündungsreaktionen durch CCL2- und TNF- α - Antagonismus	
17	
2.6.1 Beeinflussung von CCL2 mittels 7ND	17
2.6.2 Beeinflussung von TNF- α mittels Gentherapie	19
2.7 Thioglykolat-induzierte Peritonitis	20
2.8 Ziele der Arbeit	21

Inhaltsverzeichnis

3	Tiere, Material und Methoden.....	22
3.1	Materialien	22
3.2	Versuchstiere.....	22
3.2.1	Haltungsbedingungen.....	22
3.2.2	Allgemeiner Aufbau der Tierversuche.....	22
3.2.2.1	Biodistribution	22
3.2.2.2	Thioglykolat-induzierte Peritonitis	22
3.3	Viromer und mRNA-Präparationen.....	23
3.3.1	Verwendete mRNA.....	23
3.4	Versuchsaufbau.....	23
3.4.1	<i>Proof of Concept</i> mittels Zellkultur	23
3.4.1.1	Transfektionsversuch in RAW 264.7-Zellen	23
3.4.1.2	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA).....	24
3.4.2	Etablierung Thioglykolat-induzierte Peritonitis.....	25
3.4.2.1	Herstellung Thioglykolat	25
3.4.2.2	Versuchsaufbau	25
3.4.2.3	Organentnahme/ <i>Peritoneallavage</i>	26
3.4.2.4	Durchflusszytometrie	27
3.4.3	Biodistribution von <i>firefly</i> -Luciferase (FLuc)-mRNA.....	31
3.4.3.1	Versuchsaufbau	31
3.4.3.2	Organentnahme	33
3.4.3.3	Isolierung von Splenozyten.....	33
3.4.3.4	Isolierung von Hepatozyten	34
3.4.3.5	Isolierung von Knochenmarkzellen	34
3.4.3.6	Isolierung von Monozyten mittels Gradientenzentrifugation	34
3.4.3.7	Biolumineszenz-Analyse	35
3.4.3.8	7ND-mRNA Quantifizierung.....	36

Inhaltsverzeichnis

3.4.3.9 Toxizitätstest: Analyse der Aktivitäten der Leberenzyme Aspartat-Aminotransferase (AST), Alanin-Aminotransferase (ALT) und des unspezifischen Toxizitätsmarkers Laktat-Dehydrogenase (LDH)	37
3.4.4 Effektivität des zu testenden Viomer-7ND-mRNA-Komplexes im Modell der Thioglykolat-induzierten Peritonitis	37
3.4.4.1 Versuchsaufbau <i>intravenöse</i> Applikation	37
3.4.4.2 Reproduzierbarkeit der <i>intravenösen</i> Applikation und Testung der FLuc-mRNA.....	38
3.4.4.3 Versuchsaufbau für die <i>intraperitoneale</i> Applikation	40
3.4.5 Effektivität des zu testenden Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes im Modell der Thioglykolat-induzierten Peritonitis	41
3.4.5.1 Versuchsaufbau <i>intravenöse</i> Applikation	41
3.4.5.2 Reproduzierbarkeit der <i>intravenösen</i> Applikation und Testung der FLuc-mRNA.....	42
3.4.5.3 Versuchsaufbau <i>intraperitoneale</i> Applikation.....	42
3.4.6 Zusammenfassender Versuch zur <i>intravenösen</i> Applikation des Viomer-7ND-und des sTNF-RII-mRNA-Komplexes	42
3.5 Multiplexanalyse mittels Bio-Plex Pro™ Assay.....	43
3.5.1 Probenaufbereitung	44
3.5.2 Verwendete Zytokine	44
3.5.3 Statistische Analyse	45
4 Ergebnisse	46
4.1 Transfektionsversuch in RAW 246.7-Zellen	46
4.1.1 7ND-Konzentration der Zellüberstände nach Transfektion mit einem.....	46
Viomer-7ND-mRNA-Komplex	46
4.1.2 sTNF-RII-Konzentration in Zellkulturüberständen von RAW-Zellen nach Transfektion mit einem Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplex	47
4.2 Etablierung des Modells der Thioglykolat-induzierten Peritonitis.....	48
4.2.1 Bestimmung der Immunzellinfiltration ins <i>Peritoneum</i> nach Induktion der Thioglykolat-induzierten Peritonitis	48
4.3 Biodistribution	50

Inhaltsverzeichnis

4.3.1 Biolumineszenz-Analyse nach <i>intraperitonealer</i> Applikation eines Viomer- <i>firefly</i> -Luciferase-mRNA-Komplexes	50
4.3.2 Biolumineszenz nach <i>intravenöser</i> Applikation eines Viomer- <i>firefly</i> -Luciferase-mRNA-Komplexes.....	52
4.3.3 Biolumineszenz im Modell der Thioglykolat-induzierten Peritonitis.....	53
4.3.4 Quantifizierung der 7ND-mRNA nach <i>intravenöser</i> Applikation.....	54
4.4 Toxizitätstest: Analyse der Leberenzymaktivitäten AST, ALT und des unspezifischen Toxizitätsmarkers LDH.....	56
4.5 Effektivität des zu testenden Viomer-7ND-mRNA-Komplexes im Modell der Thioglykolat-induzierten Peritonitis	58
4.5.1 <i>Intravenöse</i> Applikation des Viomer-7ND-mRNA-Komplexes	58
4.5.2 Reproduzierbarkeit der <i>intravenösen</i> Applikation des Viomer-7ND-mRNA-Komplexes	61
4.5.3 Effektivität des Viomer-FLuc-mRNA-Komplexes im Modell der Thioglykolat-induzierten Peritonitis	63
4.5.4 <i>Intraperitoneale</i> Applikation des Viomer-7ND-mRNA-Komplexes.....	66
4.5.5 Vergleich <i>intraperitoneale</i> und <i>intravenöse</i> Applikation des Viomer-7ND-mRNA-Komplexes	67
4.6 Effektivität des zu testenden Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes im Modell der Thioglykolat-induzierten Peritonitis	68
4.6.1 <i>Intravenöse</i> Applikation des Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes	68
4.6.2 <i>Intraperitoneale</i> Applikation des Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes.....	73
4.6.3 Vergleich <i>intraperitoneale</i> und <i>intravenöse</i> Applikation des Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes.....	75
4.7 Zusammenfassender Versuch zur <i>intravenösen</i> Applikation des Viomer-7ND/sTNF-RII-mRNA-Komplexes	76
5 Diskussion	80
5.1 Vergleich der Viomere mit den in der Literatur beschriebenen nicht-viralen Transfektions-Vehikel für den Nukleinsäure-Transport <i>in vivo</i>	81

Inhaltsverzeichnis

5.2	Ist das Modell der Thioglykolat-induzierten Peritonitis ein geeignetes Tiermodell für die Testung von Viromeren?.....	84
5.3	Sind Viromere ein geeignetes Trägersystem für den gentherapeutischen mRNA-Transfer?	86
6	Zusammenfassung.....	89
7	Summary	91
8	Literaturverzeichnis.....	93
9	Danksagung	99
10	Anhang	100
10.1	Materialien	100
10.2	Ergebnistabellen.....	104
10.3	Bio-Plex-Analyse der Zytokinkonzentrationen.....	116

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

AAV	Adeno-assoziiertes-Virus
AGE	<i>advanced Glycation Endproducts</i>
ALT	Alanin-Aminotransferase
AST	Aspartat-Aminotransferase
CCL2	CC-Chemokinligand 2
CCL3	CC-Chemokinligand 3
CCL4	CC-Chemokinligand 4
c-IAP2	<i>cellular inhibitor of apoptosis protein 2</i>
DOPE	<i>Dioleoylphosphatdylethanolamin</i>
DMEM	<i>Dulbecco`s Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
EAE	experimentelle Autoimmun-Enzephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell scanning</i>
FADD	<i>Fas-associated protein with a death domain</i>
FasL	Fas-Ligand
FBS	fötales bovines Serum
FLuc	<i>Firefly Luciferase</i>
FSC	<i>Forward Scatter Detector</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
H ₂ O bidest.	bidestilliertes Wasser
HBSS	<i>Hank`s balanced salt solution</i>
HRP	<i>horse raddish peroxidase</i>

Abkürzungsverzeichnis

ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
IgG1	humanes Immunglobulin G, Subtyp 1
IgG2a	<i>murines</i> Immunglobulin G, Subtyp 2a
IL-1	Interleukin-1
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
IL-10	Interleukin-10
IFN- γ	Interferon- γ
i.p.	<i>intraperitoneale</i> Applikation
i.v.	<i>intravenöse</i> Applikation
KGW	Körpergewicht
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LFA-1	Leukozytenfunktionsantigen-1
MCP	<i>Monocyte chemoattractant protein</i>
MCP-2	CC-Chemokinligand 8
MCP-3	CC-Chemokinligand 7
MCP-4	CC-Chemokinligand 13
MIP-1 α	CC-Chemokinligand 3
MIP-1 β	CC-Chemokinligand 4
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
mTNF- α	membrangebundene Form des TNF- α
NaCl	Natriumchlorid
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of acitvated B-cells</i>
NK	natürliche Killerzellen
NPC	<i>nuclear pore complex</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PEI	Polyethylenimin
PF4/CXCL4	<i>Platelet Factor 4</i>

Abkürzungsverzeichnis

RANTES	CC-Chemokinligand 5
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RLU	<i>Relative Light Units</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
siRNA	<i>small-interfering RNA</i>
SSC	<i>Sideward Scatter Detektor</i>
sTNF- α	lösliche Form des TNF- α
sTNF-RII	löslicher Tumornekrosefaktor-Rezeptor II
TACE	TNF- α <i>Converting Enzym</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TNF-R	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TNF-RI	Tumornekrosefaktor-Rezeptor I
TNF-RII	Tumornekrosefaktor-Rezeptor II
TNFR:Fc	Fusionsprotein aus der Ligandenbindungsdomäne des Tumornekrosefaktor-Rezeptor II und der IgG1-Fc-Untereinheit
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TRADD	<i>Typ 1 associated death domain protein</i>
TRAF-2	<i>TNF receptor-associated factor-2</i>
TRBP	RNA-bindendes Protein
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i>
VLA-4	<i>very-late-antigen-4</i>

Abbildungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Leukozytenadhäsionskaskade	4
Abb. 2 Klassifikation und Struktur der Chemokine	6
Abb. 3 Schematische Darstellung des CC-Chemokinligand 2.....	7
Abb. 4 Signaltransduktion der TNF-Rezeptoren I	10
Abb. 5 Mechanismus der siRNA.....	11
Abb. 6 Mechanismus der liposomalen Zell-Endozytose.....	14
Abb. 7 Mechanismus eines Polymers	15
Abb. 8 Darstellung der Funktionsweise eines Viromers.....	17
Abb. 9 Versuchsaufbau Etablierung Thioglykolat-induzierte Peritonitis	26
Abb. 10 Einstellen der Detektionsfenster (FACS-Analyse).....	29
Abb. 11 Quantifizierung der Monozyten mittels FlowJo.....	30
Abb. 12 Quantifizierung der Granulozyten mittels FlowJo	31
Abb. 13 Versuchsaufbau für die Ermittlung der Biodistribution im Inflammationsmodell	33
Abb. 14 Gradientenzentrifugation mittels Percoll-Verdünnung.	35
Abb. 15 Versuchsaufbau für die Quantifizierung der 7ND-mRNA.....	36
Abb. 16 Versuchsaufbau zur Testung des Viromer-7ND-mRNA-Komplexes.....	37
Abb. 17 Versuchsaufbau zur Testung des Viromer-FLuc-mRNA-Komplexes	39
Abb. 18 Versuchsaufbau für die i.p. Applikation des Viromer-7ND-mRNA-Komplexes	40
Abb. 19 Versuchsaufbau zur Testung des Viromer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes.....	41
Abb. 20 Schematische Darstellung des Arbeitsablaufes eines Bio-Plex-Assays.....	44
Abb. 21 CCL2/7ND-Konzentration in Zellkulturüberständen transfizierter RAW-Zellen	46
Abb. 22 sTNF-RII-Konzentration in Zellkulturüberständen transfizierter RAW-Zellen	47
Abb. 23 Charakterisierung der infiltrierenden Immunzellen mittels Durchflusszytometrie....	48
Abb. 24 Bio-Plex-Analyse des Überstandes der <i>Peritoneallavage</i> und von Plasmaproben während der Modelletablierung	49
Abb. 25 Biolumineszenz-Analyse: i.p. Applikation des Viromer-FLuc-mRNA-Komplexes .	51
Abb. 26 Biolumineszenz-Analyse: i.v. Applikation des Viromer-FLuc-mRNA-Komplexes .	52
Abb. 27 Biolumineszenz-Analyse im Modell der Thioglykolat-induzierten Peritonitis	53
Abb. 28 Biodistribution: Quantifizierung der 7ND-mRNA in verschiedenen Organen.....	54
Abb. 29 Biodistribution: Quantifizierung der 7ND-mRNA (vergleichend) in verschiedenen Organen	55
Abb. 30 Toxizitätsanalyse: i.v. Applikation des Viromer-7ND-mRNA-Komplexes	56
Abb. 31 Toxizitätsanalyse: i.v.-Applikation des Viromer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes	57

Abbildungsverzeichnis

Abb. 32 Effektivität des Viomer-7ND-mRNA-Komplexes nach <i>intravenöser</i> Applikation..	59
Abb. 33 Bio-Plex-Analyse des Überstandes der <i>Peritoneallavageproben</i> und Plasmaprobe nach <i>intravenöser</i> Applikation des Viomer-7ND-mRNA-Komplexes	60
Abb. 34 Reproduzierbarkeit der i.v.-Applikation des Viomer-7ND-mRNA-Komplexes	61
Abb. 35 Bio-Plex-Analyse des Überstandes der <i>Peritoneallavageproben</i> und Plasmaprobe nach Reproduktion der i.v. Applikation des Viomer-7ND-mRNA-Komplexes.....	62
Abb. 36 Effekt des Viomer-FLuc-mRNA-Komplexes auf die Immunzellinfiltration.....	64
Abb. 37 Bio-Plex-Analyse des Überstandes der <i>Peritoneallavageproben</i> und Plasmaprobe nach <i>intravenöser</i> Applikation des Viomer-FLuc-mRNA-Komplexes	65
Abb. 38 Effektivität des Viomer-7ND-mRNA-Komplexes nach <i>intraperitonealer</i> Applikation.....	66
Abb. 39 Vergleich <i>intraperitoneale</i> und <i>intravenöse</i> Applikation des Viomer-7ND-mRNA- Komplexes.....	68
Abb. 40 Effektivität des Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes: <i>intravenöse</i> Applikation ..	69
Abb. 41 Bio-Plex-Analyse des Überstandes der <i>Peritoneallavageproben</i> und Plasmaprobe nach <i>intravenöser</i> Applikation des Viomer-sTNF-RII-Komplexes	70
Abb. 42 Reproduzierbarkeit der i.v.-Applikation des Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes	71
Abb. 43 Bio-Plex-Analyse des Überstandes der <i>Peritoneallavageproben</i> und Plasmaprobe im Reproduktionsversuch der <i>intravenösen</i> Applikation des Viomer-sTNF-RII- Komplexes.....	72
Abb. 44 <i>Intraperitoneale</i> Applikation des Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes	73
Abb. 45 Bio-Plex-Analyse des Überstandes der <i>Peritoneallavageproben</i> und Plasmaprobe nach <i>intraperitonealer</i> Applikation der Viomer-mRNA-Komplexe	74
Abb. 46 Vergleich <i>intraperitoneale</i> und <i>intravenöse</i> Applikation des sTNF-RII-mRNA- Komplexes.....	75
Abb. 47 Zusammenfassender Versuch zur i.v.-Applikation des Viomer-7ND- bzw. des sTNF-RII-mRNA-Komplexes.....	77
Abb. 48 <i>Intravenöse</i> Applikation des Viomer-Nukleinsäure-Komplexes: alle Monozyten- Zellzahlen zusammengefasst.....	78
Abb. 49 Bio-Plex-Analyse des Überstandes der <i>Peritoneallavageproben</i> und Plasmaprobe im zusammenfassenden Versuch nach <i>intravenöser</i> Applikation des Viomer-7ND- mRNA-Komplexes.....	79
Abb. 50 Vergleich der Monozytenzahlen	85

Tabellenverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Gruppeneinteilung für die Bestimmung der Biodistribution von FLuc-mRNA	32
Tab. 2 Gruppeneinteilung für die Bestimmung der Biodistribution von FLuc-mRNA mit zusätzlich ausgelöster Inflammation	32
Tab. 3 Zusammensetzung des Verdauungspuffers	33
Tab. 4 Zusammensetzung des Erythrozyten-Lyse-Puffers	34
Tab. 5 Gruppeneinteilung für die <i>intravenöse</i> Applikation des Viromer-7ND-mRNA- Komplexes	38
Tab. 6 Gruppeneinteilung für die Beurteilung der Reproduzierbarkeit der i.v.-Applikation des Viromer-7ND-mRNA-Komplexes	38
Tab. 7 Gruppeneinteilung für die <i>intravenöse</i> Applikation des Viromer-FLuc-mRNA- Komplexes	39
Tab. 8 Gruppeneinteilung für die i.p. Applikation des Viromer-7ND-mRNA-Komplexes	40
Tab. 9 Gruppeneinteilung für die <i>intravenöse</i> Applikation des Viromer-sTNF-RII-mRNA- Komplexes	41
Tab. 10 Gruppeneinteilung für die Beurteilung der Reproduzierbarkeit der i.v.-Applikation des Viromer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes	42
Tab. 11 Einteilung der Gruppen für die i.v. Applikation des Viromer-7ND- und des sTNF- RII-mRNA-Komplexes	43
Tab. 12 Standardkonzentrationen der verwendeten Zytokine I	44
Tab. 13 Standardkonzentrationen der verwendeten Zytokine II	45
Tab. 14 Geräte/Software	100
Tab. 15 Chemikalien	101
Tab. 16 Glas- und Plastikware	101
Tab. 17 Antikörper FACS und Bio-Plex (Kits)	102
Tab. 18 Zubehör und Kulturmedien für die Zellkultur	103
Tab. 19 Behandlungssubstanzen und Viromere	103
Tab. 20 Verwendete Geräte/ Materialien im Tierversuch	104
Tab. 21 7ND-Konzentration transfizierter RAW-Zellüberstände	104
Tab. 22 sTNF-RII-Konzentration transfizierter RAW-Zellüberstände	104
Tab. 23 Biolumineszenz nach 6h: i.v.-Applikation des Viromer-FLuc-mRNA-Komplexes	105
Tab. 24 Biolumineszenz nach 24h: i.v.-Applikation des Viromer-FLuc-mRNA-Komplexes	105

Tabellenverzeichnis

Tab. 25 Biolumineszenz nach 6h: i.p.-Applikation des Viomer-FLuc-mRNA-Komplexes.	105
Tab. 26 Biolumineszenz nach 24h: i.p.-Applikation des Viomer-FLuc-mRNA-Komplexes	
.....	106
Tab. 27 Biolumineszenz im Modell der Thioglykolat-induzierten Peritonitis.....	106
Tab. 28 Biodistribution: Quantifizierung der 7ND-mRNA, vergleichend.....	106
Tab. 29 Biodistribution: Quantifizierung der 7ND-mRNA im Plasma	107
Tab. 30 Biodistribution: Quantifizierung der 7ND-mRNA im Knochenmark	107
Tab. 31 Biodistribution: Quantifizierung der 7ND-mRNA in der Leber.....	107
Tab. 32 Biodistribution: Quantifizierung der 7ND-mRNA in der Milz	108
Tab. 33 Biodistribution: Quantifizierung der 7ND-mRNA in den Lavagezellen	108
Tab. 34 Toxizitätsanalyse: i.v.-Applikation des Viomer-7ND-mRNA-Komplexes.....	109
Tab. 35 Toxizitätsanalyse: i.v.-Applikation des Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes.....	109
Tab. 36 Effektivität des Viomer-7ND-mRNA-Komplexes: i.v.-Applikation	110
Tab. 37 Reproduzierbarkeit der i.v.-Applikation des Viomer-7ND-mRNA-Komplexes.....	110
Tab. 38 Effektivität des Viomer-FLuc-mRNA-Komplexes	111
Tab. 39 Effektivität des Viomer-7ND-mRNA-Komplexes: i.p.-Applikation	111
Tab. 40 Vergleich i.p.- und i.v.-Applikation des Viomer-7ND-mRNA-Komplexes.....	112
Tab. 41 Effektivität des Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes: i.v.-Applikation	113
Tab. 42 Reproduzierbarkeit der i.v.-Applikation des Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes	
.....	113
Tab. 43 Effektivität des Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes: i.p.-Applikation	114
Tab. 44 Vergleich i.p.- und i.v.-Applikation des Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes ...	114
Tab. 45 Zusammenfassender Versuch: Viomer-7ND- bzw. -sTNF-RII-mRNA-Komplexe	115
Tab. 46 Etablierung Thioglykolat-induzierte Peritonitis: Zytokinkonzentrationen im	
Lavageüberstand	116
Tab. 47 Etablierung Thioglykolat-induzierte Peritonitis: Zytokinkonzentrationen im Plasma	
.....	116
Tab. 48 I.v.-Applikation des Viomer-7ND-mRNA-Komplexes: Zytokinkonzentrationen in	
Lavageüberständen.....	117
Tab. 49 I.v.-Applikation des Viomer-7ND-mRNA-Komplexes: Zytokinkonzentrationen im	
Plasma	118
Tab. 50 Reproduzierbarkeit der i.v.-Applikation des Viomer-7ND-mRNA-Komplexes:	
Zytokinkonzentrationen im Lavageüberstand.....	119

Tabellenverzeichnis

Tab. 51 Reproduzierbarkeit der i.v.-Applikation des Viomer-7ND-mRNA-Komplexes: Zytokinkonzentrationen im Plasma	120
Tab. 52 Effektivität des Viomer-FLuc-mRNA-Komplexes: Zytokinkonzentrationen im Lavageüberstand	121
Tab. 53 Effektivität des Viomer-FLuc-mRNA-Komplexes: Zytokinkonzentrationen im Plasma	121
Tab. 54 I.p.-Applikation des Viomer-7ND-mRNA-Komplexes: Zytokinkonzentrationen im Lavageüberstand	122
Tab. 55 I.p.-Applikation des Viomer-7ND-mRNA-Komplexes: Zytokinkonzentrationen im Plasma	123
Tab. 56 I.v.-Applikation des Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes: Zytokinkonzentrationen im Lavageüberstand	124
Tab. 57 I.v.-Applikation des Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes: Zytokinkonzentrationen im Plasma	125
Tab. 58 Reproduzierbarkeit der i.v.-Applikation des Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes: Zytokinkonzentrationen im Lavageüberstand.....	126
Tab. 59 Reproduzierbarkeit der i.v.-Applikation des Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes: Zytokinkonzentrationen im Plasma	126
Tab. 60 I.p.-Applikation des Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes: Zytokinkonzentrationen im Lavageüberstand	127
Tab. 61 I.p.-Applikation des Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes: Zytokinkonzentrationen im Plasma	128
Tab. 62 Effektivität des Viomer-7ND- bzw. -sTNF-RII-mRNA-Komplexes: Zytokinkonzentrationen im Lavageüberstand.....	129
Tab. 63 Effektivität des Viomer-7ND- bzw. des -sTNF-RII-mRNA-Komplexes: Zytokinkonzentrationen im Plasma	130

1 Einleitung und Fragestellung

Eine Entzündung ist eine lokale Reaktion des Gewebes auf eine *endogene* oder *exogene* Schädigung und dient der Beseitigung der Noxe, der lokalen Begrenzung des Schadens und dessen Reparatur. Viele derzeit zugelassene biologische Wirkstoffe gegen schwerwiegende Entzündungsprozesse, wie zum Beispiel rheumatoide Arthritis oder Multiple Sklerose, werden mittels komplexer und teurer Verfahren aufwändig biotechnologisch hergestellt. Eine Alternative könnte zukünftig die gezielte Expression von biologischen Wirkstoffen im Patienten mittels Gentherapie darstellen. Durch Einschleusen von Genen könnten typische Entzündungsmediatoren gezielt beeinflusst werden. Im weiteren Sinne umfasst Gentherapie dabei unter anderem den Ersatz defekter Gene durch das Einbringen intakter Kopien (= positive Genregulation) oder die Inaktivierung pathogener Genprodukte (= negative Genregulation). In beiden Fällen kommt es zu einer transienten Regulation der Genexpression ohne eine dauerhafte Änderung der genetischen Information in somatischen Zellen. Das entscheidende Hindernis bei der Entwicklung von Gentherapien war in der Vergangenheit der Transport des genetischen Materials in die Zielzellen *in vivo* (Schulze-Bergkamen 2008). Es existiert daher ein fundamentaler Bedarf an solchen Trägersystemen. Viromere stellen diesbezüglich eine neue und aussichtsreiche Lösung dar. Mittels Viromertechnologie können Immunzellen, insbesondere Monozyten/Makrophagen und dendritischen Zellen, transfiziert werden. Dabei wird der Mechanismus genutzt, den auch Grippeviren verwenden, um in Zellen zu gelangen. Viromere selbst sind jedoch keine Viren, sondern chemisch synthetisierte und modifizierte Polymere. Die neutrale Oberfläche der Viromerpartikel ermöglicht dabei eine „stille“ Endozytose von Nukleinsäuren, ohne dass das Viromer Membranelemente in Mitleidenschaft zieht.

Ziel der Studie waren Untersuchungen zur Eignung von Viromeren als neuartige Trägermaterialien für die Gentherapie. Dafür wurden mRNAs, welche Antagonisten gegen die etablierten Wirkstoffziele CCL2 und TNF- α kodieren, in einem geeigneten entzündlichen Tiermodell hinsichtlich ihrer Wirksamkeit und Sicherheit beurteilt.

2 Literaturübersicht

2.1 Entzündungen

Eine Entzündung ist ein Mechanismus, um den Organismus vor der Schädigung durch verschiedene Noxen zu schützen. Bei diesen Noxen kann es sich um körpereigene oder körperfremde Substanzen handeln, wie beispielsweise Infektionserreger, chemische Substanzen, Gewebnekrosen oder Traumata (MacGavin und Zachary 2009). Diese aktivieren das angeborene Immunsystem und somit immunkompetente Zellen, welche wiederum durch die Sekretion von vasoaktiven Mediatoren, chemoattraktiven Substanzen und Zytokinen eine Reaktion vermitteln. Dadurch kommt es zur Beseitigung der schädigenden Substanz, eine Ausbreitung dieser wird verhindert und der Defekt wird anschließend repariert.

Eine Entzündung ist gekennzeichnet durch die folgenden Kardinalsymptome: *Calor* (Rötung), *Rubor* (Erwärmung), *Tumor* (Schwellung), *Dolor* (Schmerz) und *Functio laesa* (Funktionsverlust des betroffenen Gewebes) (Egger 2005).

2.2 Pathophysiologie von Entzündungsprozessen - Übersicht

Eine Entzündungsreaktion setzt sich aus verschiedenen funktionellen Komponenten zusammen und wird durch diverse Regulatoren gesteuert. Endogene (z.B. Überempfindlichkeitsreaktionen) und exogene (z.B. Viren, Bakterien, Parasiten, Fremdkörper) Noxen werden von *Toll-like-Rezeptoren* der Gewebsmakrophagen und anderen Leukozyten erkannt, wodurch diese Chemokine und Zytokine freisetzen und somit eine darauffolgende Entzündung auslösen. Chemische Mediatoren, wie zum Beispiel Prostaglandine, führen zu einer Vasodilatation der zuführenden Arteriolen und es kommt zur verstärkten Durchblutung (aktive Hyperämie) des entzündeten Gewebes (Williams 1977). Infolge des erhöhten Blutstromes und der Permeabilitätsstörung kommt es zur Exsudation von Plasma und Plasmaproteinen in das umliegende Gewebe (Ödembildung). Infolge der Vasodilatation gelangen unter anderem Komplementkomponenten in das entzündete Gewebe. Die Bindung einzelner Komplementfaktoren an die Oberfläche von Bakterien bewirkt die Komplementaktivierung. Das Komplementsystem führt unter anderem zur Markierung (Opsonisierung) der Bakterien für Makrophagen. Des Weiteren wird durch die Aktivierung eines Membranangriffskomplexes die Bakterienoberfläche für Enzyme, die zur Lyse des Bakteriums führen, durchlässig gemacht. Außerdem bewirken einige Spaltprodukte der Komplementfaktoren eine Chemotaxis für Entzündungszellen (Ryan und Majno 1977).

Durch den verlangsamten Blutfluss kommen Leukozyten in Kontakt mit Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen, wodurch die Voraussetzung der Emigration durch das Gefäßendothel

geschaffen wird (Leukozytenadhäsionskaskade). Da die Konzentration der chemotaktischen Moleküle im entzündeten Gewebe am höchsten ist, bewegen sich die weißen Blutzellen auf Grund eines chemotaktischen Konzentrationsgradienten zum Gewebsschaden hin (Shihata et al. 2016).

Im entzündeten Gewebe phagozytieren neutrophile Granulozyten und Makrophagen Gewebstrümmer und Bakterien oder bekämpfen das Fremdmaterial mit biochemischen Wirkstoffen, die durch Degranulation freigesetzt werden.

Die entzündungsauslösenden Noxen oder Bakterien werden mit spezifischen Antikörpern markiert, welche an F_c -Rezeptoren der Leukozyten binden. Im Anschluss daran stülpt sich die Zellmembran der Leukozyten über die Noxe oder Bakterien und bildet das sogenannte *Phagosom*. Das *Phagosom* fusioniert anschließend mit einem Lysosom und bildet ein Enzyme-enthaltendes *Phagolysosom*. Durch diese Enzyme werden die Bakterien zerstört, wobei unter anderem Sauerstoffradikale zum Einsatz kommen (Ryan und Majno 1977).

Die Reparationsphase beginnt mit der Bildung von Granulationsgewebe in den nekrotischen Zellen. Das Granulationsgewebe bildet sich zu kollagenhaltigem Bindegewebe zurück und wird reepithelialisiert. Nach der Beseitigung der stimulierenden Noxe endet die Entzündung (MacGavin und Zachary 2009).

2.3 Monozyten

Monozyten werden aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark gebildet und können unter physiologischen Bedingungen in verschiedene Gewebe auswandern, wo sie sich zu spezifischen ortsständigen oder freien Gewebsmakrophagen differenzieren. So entwickeln sich die Monozyten zum Beispiel im Bindegewebe zu Histiozyten, in der Leber zu Kupfer-Zellen und in der Lunge zu Alveolarmakrophagen (van Furth und Cohn 1968).

Während einer Entzündung werden Monozyten unter anderem durch das „*monocyte chemoattractant protein 1*“ (heute als CC-Chemokinligand-2 [CCL2] bezeichnet) angelockt und gelangen somit in das entzündete Gewebe (siehe 2.3.2). Der Austritt aus den Blutgefäßen folgt dabei dem Mechanismus der Leukozytenadhäsionskaskade (siehe Abb. 1). Nach der Abgabe entzündlicher Mediatoren (zum Beispiel CCL2) aus Makrophagen im entzündeten Gewebe, werden Adhäsionsmoleküle (zum Beispiel L-Selektin) vom Endothel exprimiert. Die Adhäsionsmoleküle binden die Monozyten temporär an die Endothelzellen, wodurch sich ihre Migrationsgeschwindigkeit verringert. Durch den ständigen Wechsel von Bindung an das Endothel und Lösen vom Endothel, fangen die Monozyten an, entlang der Gefäßwand zu rollen („*Rolling*“). Durch proinflammatorische Zytokine wie den Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α)

kommt es zur weiteren Verlangsamung der Geschwindigkeit („*Slow Rolling*“). Durch die Aktivierung der Monozyten durch diverse Zytokine (TNF- α , Interleukin-1 [IL-1], Interleukin-6 [IL-6]), Komplementfaktoren [z.B. C5a] und Chemokine werden die Selektine proteolytisch gespalten und Membranproteine (zum Beispiel Leukozytenfunktionsantigen-1 [LFA-1], Makrophagenantigen-1, „*very-late-antigen-4*“ [VLA-4]) gebildet. Diese führen über *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1) und *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1) zur festen Adhäsion der Monozyten an das Endothel (Gerszten et al. 1999). Die Monozyten migrieren anschließend entlang des Konzentrationsgradienten des CCL2 durch das Endothel in das entzündete Gewebe (Transmigration). Dort werden die Monozyten durch verschiedene Reize aktiviert, die wiederum zu spezifischen Reaktionen führen.

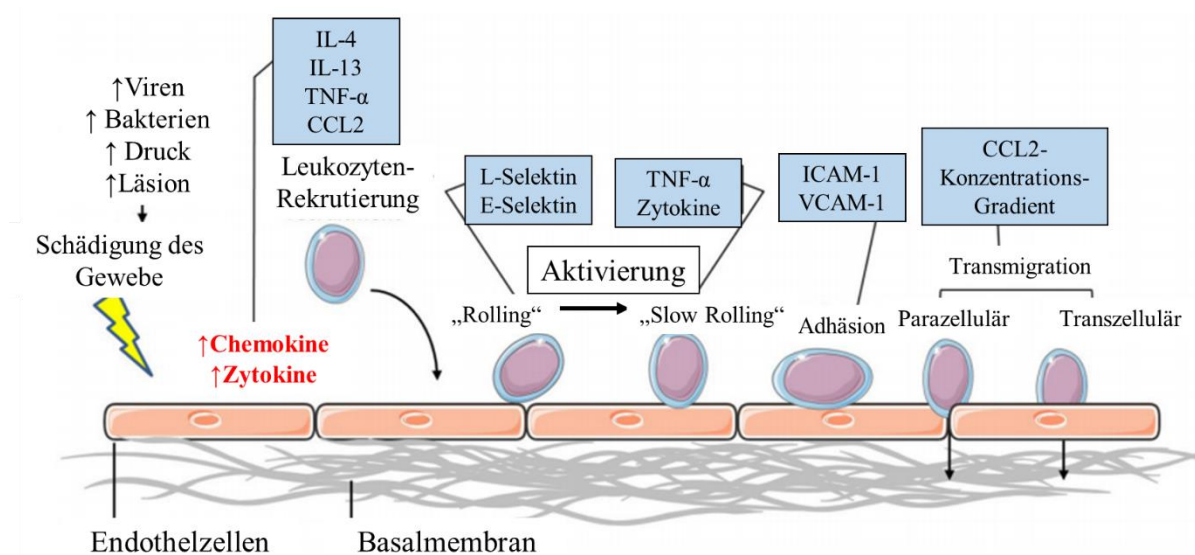


Abb. 1 Leukozytenadhäsionskaskade

Die Leukozytenadhäsionskaskade beschreibt die Migration der Leukozyten entlang eines chemotaktischen Konzentrationsgradienten. Durch einen Gewebeschaden werden Zytokine und Chemokine ausgeschüttet, welche Leukozyten anlocken. Durch die temporäre Bindung der Leukozyten an die Adhäsionsmoleküle (L-Selektin und E-Selektin) des Endothels, kommt es zum „Rollen“ der Leukozyten entlang des Endothels. Durch ICAM-1 und VCAM-1 kommt es zu einer festen Adhäsion der Leukozyten am Endothel. Anschließend gelangen die Leukozyten durch Transmigration durch das Endothel. (modifiziert nach Shihata et al. 2016)

Eine unspezifische Aktivierung durch die Bindung von mikrobiellen Produkten oder endogenen Molekülen an *Toll-like-Rezeptoren* führt zur Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies, Stickstoffmonoxid, Interferon- α und Interferon- β . Die klassische Aktivierung durch Interferon- γ (IFN- γ) führt durch *Respiratory Burst* und die Freisetzung von IL-1 und Tumornekrosefaktoren (TNF) zur Abtötung der Erreger (Forman und Torres 2002).

2.3.1 Zytokine

Zytokine werden von Lymphozyten, Makrophagen, Endothelzellen, Granulozyten, Mastzellen, Epithelzellen und Bindegewebszellen gebildet. Sie aktivieren, stimulieren oder hemmen diverse Zelltypen während einer Entzündungsreaktion. Dabei werden Zytokine nach ihrer Funktion in verschiedene Gruppen eingeteilt: hämatopoetische Wachstumsfaktoren (z.B. Interleukin-3), chemotaktische Zytokine (z.B. Interleukin-8), Entzündungsmediatoren (z.B. IL-1, IL-6, TNF) und Zytokine für T-Zellen (z.B. Interleukin-2, Interleukin-4).

Zu den Zytokinen gehören auch die Chemokine, die von allen kernhaltigen Zellen (zum Beispiel Epithelzellen, Makrophagen, Endothelzellen) gebildet werden (MacGavin und Zachary 2009).

Der *Platelet Factor 4* (PF4/CXCL4) wurde 1977 als erstes Chemokin entdeckt (Wu et al. 1977). Seit dem wurden über 50 Chemokine und 20 Chemokinrezeptoren beschrieben (Moser et al. 2004). Der Großteil der Chemokine hat eine molekulare Masse von 8-12 kDa (Rollins 1997) und zeigt eine 20-90 %-ige Homologie in Bezug auf die Aminosäuresequenz auf (Deshmane et al. 2009). Chemokine besitzen einen ungeordneten Amino-Terminus, einen Hauptkörper aus einem dreisträngigen antiparallelen β -Faltblatt und einen mit einer α -Helix endenden Carboxy-Terminus (Fernandez und Lolis 2002). Es gibt vier verschiedene Chemokin-Familien, die sich durch die Anzahl und Position der Cysteinreste am Amino-Terminus unterscheiden (siehe Abb. 2). Bei der CC-Familie folgen die ersten beiden Cysteine direkt aufeinander. Zu dieser Familie gehören zum Beispiel das *Macrophage inflammatory protein-1 α* (CCL3) und *-1 β* (CCL4), sowie das *monocyte chemoattractant protein-1* (CCL2). Sie alle binden an entsprechende CC-Chemokin-Rezeptoren. Bei der CXC-Familie sind die ersten beiden Cysteine durch eine Aminosäure voneinander getrennt. Zu dieser Familie gehören zum Beispiel das *granulocyte chemoattractant protein-2*, sowie Interleukin-8. Sie binden alle an entsprechende CXC-Chemokin-Rezeptoren. Des Weiteren zählt auch das C-Chemokin Lymphotactin (bei dem ein einzelnes Cystein am Amino-Terminus steht) und das CX3C-Chemokin Fraktalkin (bei dem die ersten beiden Cysteine durch drei Aminosäuren voneinander getrennt sind) zu den Chemokinen.

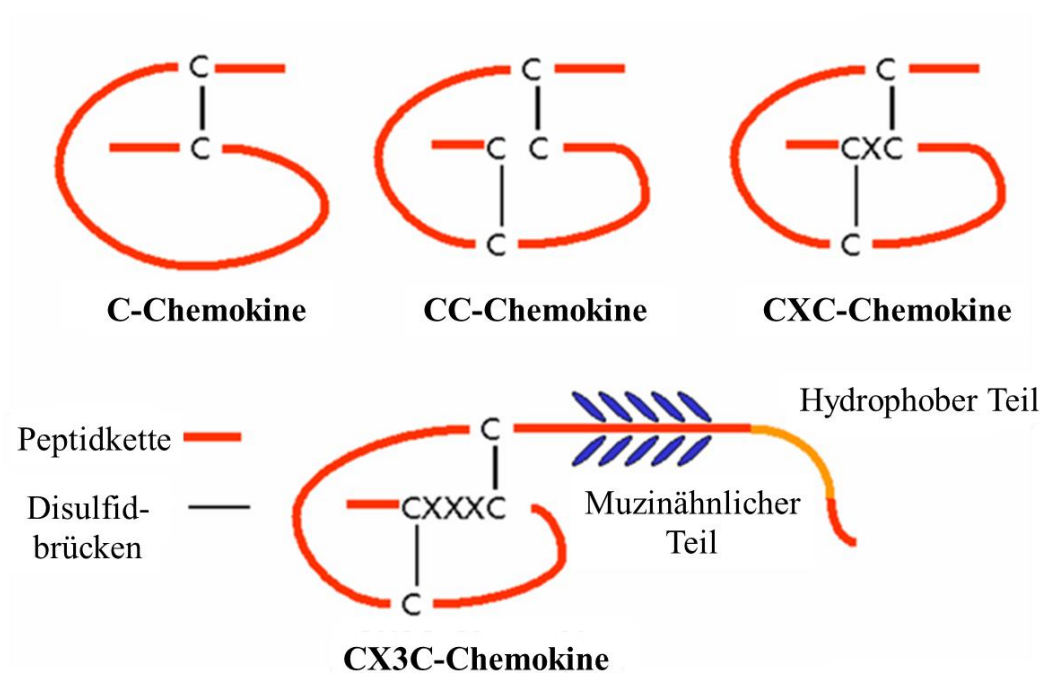


Abb. 2 Klassifikation und Struktur der Chemokine

Unterscheidung der Chemokinfamilien anhand der Anzahl und Position der Cysteinreste (Kohidai, L. CC BY 3.0 2008)

Jeder der genannten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren besitzt sieben Helices, die den Rezeptor in der Membran verankern. An diese Rezeptoren der Zielzellen binden die Chemokine mit ihrem N-terminalen Ende und aktivieren diesen. Während dessen bindet das C-terminale Ende der Chemokine an die Glykosaminoglykane der Endothelzellen, um nicht mit dem Blutstrom fortgespült zu werden (Proudfoot et al. 2003). Die Chemokine mit proinflammatorischen Eigenschaften werden während einer Entzündung als Reaktion auf bakterielle Bestandteile oder ausgeschüttete Zytokine von eingewanderten Leukozyten exprimiert. Sie fördern die Migration und Chemotaxis von Leukozyten. Homöostatische Chemokine navigieren während der Hämatopoese die Leukozyten zu und innerhalb der sekundären lymphatischen Gewebe, sowie ins Knochenmark und zur Thymusdrüse (Moser et al. 2004; Wagner et al. 2007).

2.3.2 CC-Chemokinligand-2 (CCL2)

Der CC-Chemokinligand-2 (früher bezeichnet als *monocyte chemoattractant protein-1*) gehört zur Familie der CC-Chemokine. Mit CC-Chemokinligand 8 (MCP-2), CC-Chemokinligand 7 (MCP-3) und CC-Chemokinligand 13 (MCP-4) bildet es die Unterfamilie der *Monocyte chemoattractant proteins* (MCPs) (Charo und Ransohoff 2006). CCL2 besteht aus 76 Aminosäuren und hat eine molare Masse von 13 kDa. Der Aufbau von CCL2 ist in Abb. 3 schematisch dargestellt.

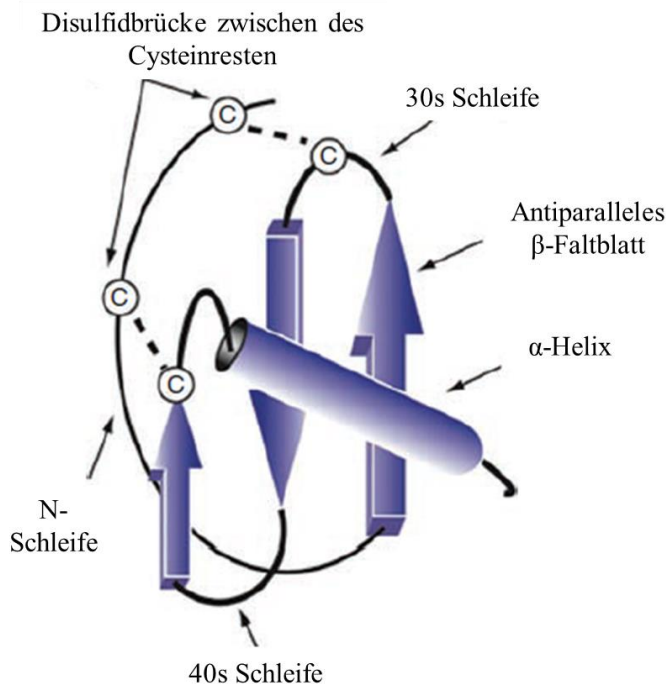


Abb. 3 Schematische Darstellung des CC-Chemokinligand 2

Die hochflexible N-terminale Domäne ist am Rest des Moleküls durch Disulfidbrücken verankert, an denen die beiden Cysteine der N-terminalen Domäne beteiligt sind. Darauf folgt eine erweiterte Schleife, die zu den drei antiparallelen β -Faltblättern führt. Die β -Faltblätter bilden eine flache Basis, über die sich eine C-terminale α -Helix erstreckt. (modifiziert nach Deshmane et al. 2009)

Das CCL2-kodierende Gen liegt auf dem humanem Chromosom 17 (van Coillie et al. 1996). Der CC-Chemokinligand-2-Rezeptor (CCR2) wird von Monozyten, T-Zellen, basophilen Granulozyten und dendritischen Zellen exprimiert. CCR2 ist ein G-Protein-gekoppelter 7-Transmembranhelices-umfassender Rezeptor. Wie viele der CC-Rezeptoren bindet CCR2 mehrere CC-Chemokinliganden, wie zum Beispiel neben CCL2 auch CCL7, CCL8 und CCL13 (Yadav et al. 2010).

CCL2 wird unter anderem von Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten, Epithelzellen und Endothelzellen gebildet. Induziert durch oxidativen Stress, Zytokine (vor allem IL-1 β , IFN- γ und TNF- α) oder Wachstumsfaktoren, schütten diese Zellen CCL2 aus (van Coillie et al. 1996; Takahashi et al. 2009). Das am Endothel gebundene CCL2 bindet als Dimer an CCR2 von im Blut zirkulierenden Monozyten und lockt diese mittels chemotaktischen Konzentrationsgradienten in das entzündete Gewebe (Gerszten et al. 1999). Des Weiteren reguliert CCL2 die Migration und Infiltration von T-Gedächtniszellen und natürlichen Killerzellen (NK) (Deshmane et al. 2009). Zusätzlich erhöht CCL2 die Expression von β_2 -Integrin, welches ein Adhäsionsmolekül für die Transmigration der Monozyten darstellt (Jiang

et al. 1992; Vaddi und Newton 1994). CCL2 vermittelt außerdem einen oxidativen *Burst* in Monozyten (Rollins et al. 1991).

CCL2 spielt bei einigen inflammatorischen Prozessen eine entscheidende Rolle in Bezug auf die Monozytenakkumulation, zum Beispiel bei rheumatoider Arthritis (Koch et al. 1992), *inflammatory bowel disease* (Singh et al. 2016) und Arteriosklerose (Gu et al. 1998; Spoettl et al. 2006) und ist daher ein Zielprotein für die Entwicklung neuartiger Wirkstoffe.

2.3.3 Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)

TNF- α wurde 1975 entdeckt, als Tumorgewebe, das mit Bakterien infiziert war, teilweise kleiner wurde und sogar verschwand. Da man damals davon ausging, dass dieser Faktor eine nekrotische Wirkung auf den Tumor hatte, nannte man ihn Tumornekrosefaktor (Carswell et al. 1975; MacEwan 2002). Erst 2002 wurde entdeckt, dass als Reaktion auf bakterielle Lipopolysaccharide TNF- α von den Zellen der Patienten selbst ausgeschüttet wurde (MacEwan 2002).

TNF- α ist ein Zytokin und gehört zur Tumornekrosefaktor- (TNF)/ Tumornekrosefaktor-Rezeptor- (TNFR) Superfamilie. Die TNF-Superfamilie besteht aus 19 Zytokinen, wie zum Beispiel Lymphotoxin- α , *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) und Fas-Ligand (FasL) (Croft und Siegel 2017). All diese Mitglieder bestehen aus einem Typ II Transmembranprotein. TNF- α hat in der membrangebundenen Form (mTNF- α) eine molare Masse von 26 kDa und kann durch die Matrix-Metalloprotease *TNF- α converting enzyme* (TACE) in die lösliche Form (sTNF- α) mit einer molaren Masse von 17 kDa prozessiert werden. TNF- α wird von aktivierten Makrophagen, Monozyten, Lymphozyten, Endothelzellen und NK, nach der Stimulation durch bakterielle Lipopolysaccharide, mikrobielle Antigene, Enterotoxine oder TNF- α selbst, produziert (Yang et al. 2018). TNF- α spielt bei Entzündungserkrankungen eine entscheidende Rolle, da es die Produktion von inflammatorischen Zytokinen fördert, die Adhäsion und Permeabilität der Endothelzellen steigert und chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten wirkt (Pasparakis et al. 1996; Mackay et al. 1993). Zu der TNFR-Superfamilie gehören 29 Typ I Transmembranprotein-Rezeptoren, welche durch eine cysteinreiche extrazelluläre Sequenzhomologie charakterisiert sind. Die TNF-Rezeptor-Untereinheiten bilden ein Trimer und sind durch eine extrazelluläre, eine transmembrane und eine intrazelluläre Domäne gekennzeichnet (Yang et al. 2018). TNF- α bindet an die TNF-Rezeptoren I und II (TNF-RI und TNF-RII), die eine Sequenzhomologie von 28 %, hauptsächlich auf den extrazellulären Teil beschränkt, aufweisen (MacEwan 2002). Beide Membranrezeptoren können ebenfalls durch

TACE in eine lösliche Form umgewandelt werden. TNF-RI kommt auf fast allen kernhaltigen Zellen des Körpers vor und wird konstitutiv exprimiert. TNF-RI wird hauptsächlich durch sTNF- α aktiviert, da sTNF- α leicht, schnell, sehr stabil und mit einer langsamen Dissoziationsrate ($t_{1/2} = 33$ Minuten) an TNF-RI bindet (Grell et al. 1998). Nach der Rezeptoraktivierung aktiviert die intrazelluläre Rezeptordomäne des TNF-RI das *Typ 1-associated death domain protein* (TRADD), welches 2 verschiedene Signalkomplexe bilden kann (Abb. 4). TRADD rekrutiert ein *Fas-associated protein with a death domain* (FADD), welches mit Caspase 8 und Caspase 10 interagiert. Dies führt wiederum über die Aktivierung von Caspase 3 und Caspase 7 zur Apoptose der Zelle. Für den zweiten Signalkomplex bindet TRADD an den *TNF receptor-associated factor-2* (TRAF-2) und vermittelt die Aktivierung des Transkriptionsfaktors *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* (NF- κ B) (Abb. 4). NF- κ B reguliert die Transkription von vielen verschiedenen Genen, welche zum Beispiel mit Zelldifferenzierung, Apoptose, Zellreifung und Produktion von inflammatorischen Zytokinen verknüpft sind (Sheng et al. 2018). TNF-RII kommt hauptsächlich auf Zellen des Immunsystems, wie T-Lymphozyten (vor allem regulatorische T-Lymphozyten), aber auch auf Endothelzellen, Mikroglia oder Kardiomyozyten vor (Speeckaert et al. 2012). TNF-RII wird hauptsächlich von mTNF- α aktiviert, da sTNF- α sehr schnell dissoziiert und somit nicht in der Lage ist, den Rezeptor zu aktivieren. TNF-RII kann durch verschiedene Zelltypen in seine lösliche Form (sTNF-RII) überführt werden. sTNF-RII kann freies sTNF- α binden und verhindert dadurch eine überschießende Aktivierung der TNF-Rezeptoren (van Mierlo et al. 2008). Nach der Aktivierung des Rezeptors kann TRAF2 direkt an die intrazelluläre Domäne des TNF-RII binden und über verschiedene Signalwege NF- κ B aktivieren und somit die Proliferation und Zytokinproduktion fördern. NF- κ B reguliert unter anderem das *cellular inhibitor of apoptosis protein 2* (c-IAP2), welches an TRAF2 bindet. Dadurch wird die Aktivierung von Caspase 8 blockiert und die Apoptose-Einleitung gehemmt (MacEwan 2002).

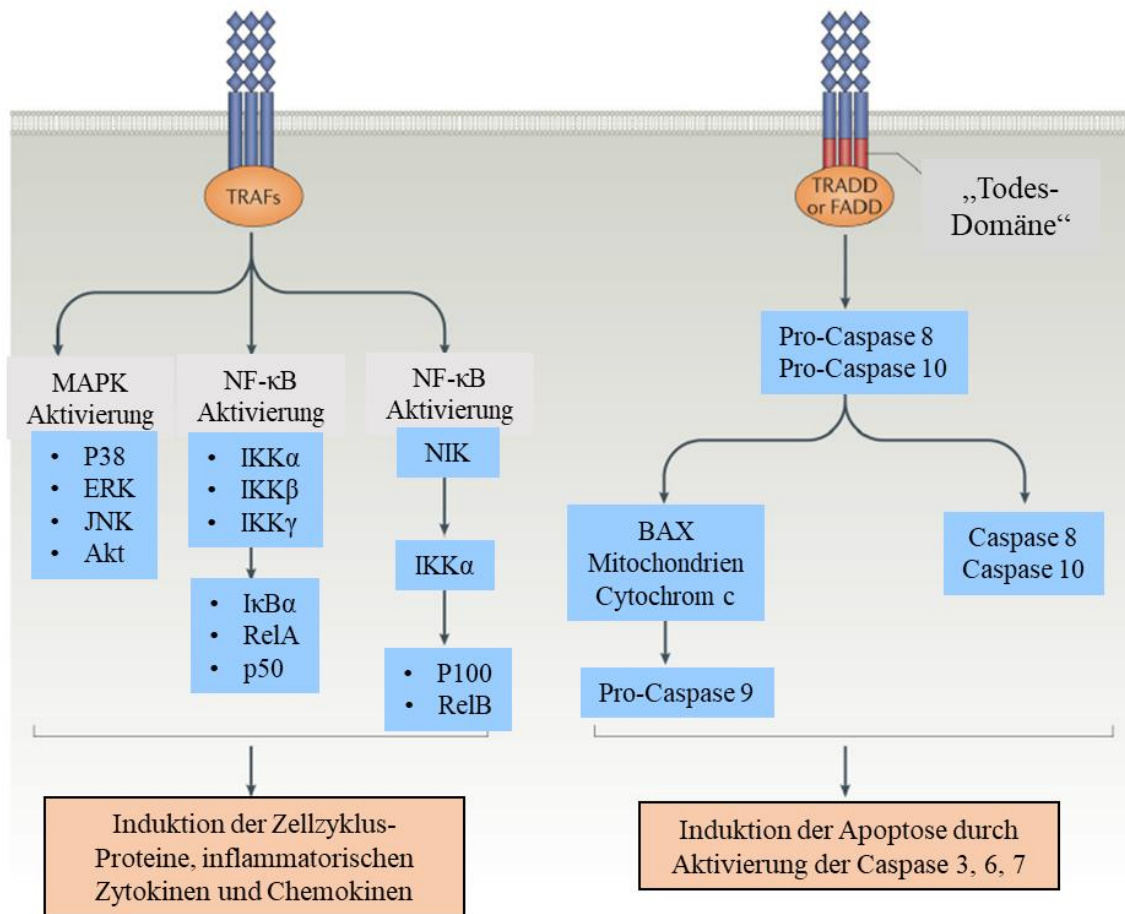


Abb. 4 Signaltransduktion der TNF-Rezeptoren I

Nach der Aktivierung des TNF-RI durch TNF- α können zwei verschiedene Signalwege aktiviert werden. Über TRAFs wird der NF- κ B-Pfad aktiviert, der zur Induktion von Zellzyklus-Proteinen, sowie inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen führt. Durch TRADD und FADD wird über verschiedene Caspasen die Apoptose der Zelle induziert (modifiziert nach Croft und Siegel 2017).

Die pathologische Produktion von TNF- α spielt in vielen inflammatorischen Erkrankungen eine wichtige Rolle, so zum Beispiel bei rheumatoider Arthritis, Morbus Alzheimer und Multipler Sklerose. Die neutralisierende Wirkung von sTNF-RII wird daher im biologischen Wirkstoff Etanercept, ein TNF-Inhibitor, zur Therapie der rheumatoiden Arthritis verwendet.

2.4 Somatische Gentherapie

Die somatische Gentherapie umfasst das Einbringen von Genen in somatische Zellen, um durch deren Expression und Funktion einen therapeutischen Nutzen zu erzielen (Hallek et al. 2001). Bei der transienten Gentherapie handelt es sich um eine zeitweise Änderung der genetischen Information zur Regulation der Genexpression in somatischen Zellen. Die Regulation der Genexpression erfolgt ausschließlich auf translationaler Ebene. Durch das Einbringen einer intakten Kopie eines defekten Gens, kann dessen gezielte Produktion an einem bestimmten Ort im Körper vermittelt werden. Den gleichen Effekt erreicht man durch das Einbringen einer

messenger-RNA (mRNA) in Körperzellen, welche das gewünschte Protein anschließend selbstständig produzieren. Es kann auch eine *small-interfering RNA* (siRNA) eingeschleust werden, welche sich in der Zelle zu einem *RNA-induced silencing complex* (RISC) zusammenlagert (Abb. 5). Dadurch kommt es zur Entwindung der doppelsträngigen siRNA und der entstandene Einzelstrang-Komplex kann an die gewünschte komplementäre mRNA binden. Durch die Endonukleaseaktivität des RISC wird die Ziel-mRNA gespalten und das durch diese mRNA kodierte pathogene Protein kann nicht mehr synthetisiert werden (Jinek und Doudna 2009).

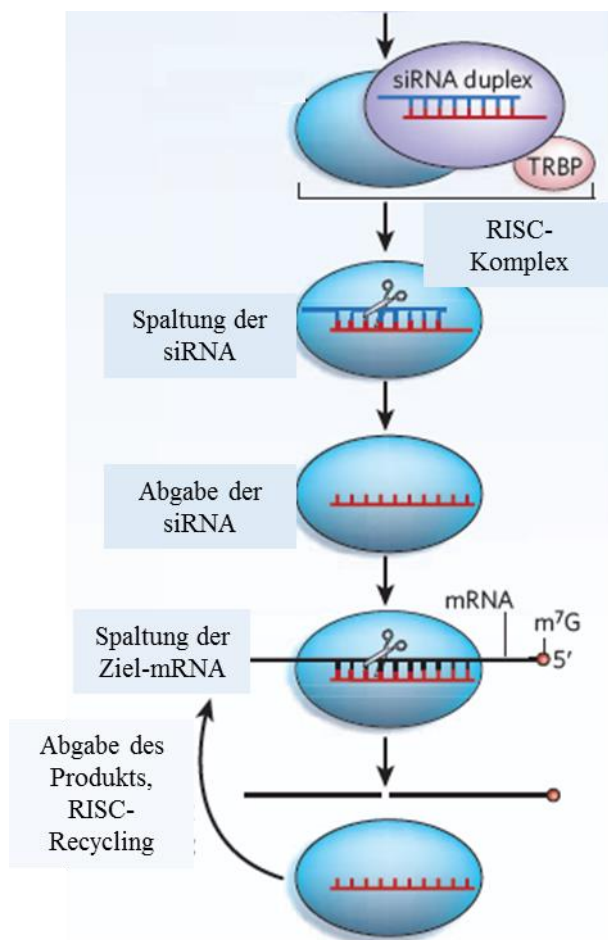


Abb. 5 Mechanismus der siRNA

Nach der Applikation der siRNA lagert sich diese zu einem *RNA-induced silencing complex* (RISC) zusammen (TRBP = RNA-bindendes Protein). Die doppelsträngige siRNA wird entwunden und gespalten. Der entstandene Einzelstrang-Komplex kann sich an eine komplementäre Ziel-mRNA anlagern. Die mRNA wird durch die Endonukleaseaktivität des RISC gespalten. Dadurch wird das durch diese mRNA kodierte Protein nicht mehr synthetisiert. (modifiziert nach Jinek und Doudna 2009)

2.4.1 Methoden des Gentransfers

Man unterscheidet zwei verschiedene Methoden des Gentransfers, wobei das gewünschte Gen oder die gewünschte Ribonukleinsäure (RNA) für den Transport immer in ein Trägermaterial verpackt wird, da reine Nukleinsäuren durch die im Organismus vorhandenen Desoxyribonukleasen (DNasen) sofort abgebaut werden. Das Vehikel dient somit dem Schutz der Nukleinsäure vor Abbau, der Überwindung der Membranbarriere und der Zielsteuerung. Bei *ex vivo*-Verfahren werden Zellen aus dem Körper entnommen (beispielsweise durch eine Blutentnahme) und aufgereinigt. Anschließend erfolgt der Gentransfer mit entsprechenden Trägermaterialien in der Zellkulturschale, gefolgt von erneuter Aufreinigung. Die modifizierten Zellen werden daraufhin zum Beispiel durch eine Infusion wieder in den Körper eingebracht. Beim *in vivo*-Verfahren wird der Komplex aus Vehikel und Nukleinsäure nach der Herstellung direkt, beispielsweise durch eine Injektion in die Blutbahn, in den Organismus appliziert. Daraufhin erfolgt der Transport des Trägermaterials zu Zielzellen mit dem Blutstrom.

Zusätzlich müssen die Trägermaterialien so konzipiert sein, dass sie bis zur Zielzelle gelangen und nicht vorher durch Serumbestandteile abgebaut werden (Hallek et al. 2001).

Folgende Anforderungen werden an die Vehikel in der Gentherapie gestellt:

1. hohe Effizienz, um möglichst viele Zellen zu infizieren
2. einfache und reproduzierbare Herstellung
3. hohe Selektivität, um gezielt an das Genom der Zielzelle zu integrieren
4. Transport ausschließlich zur gewünschten Zielzelle
5. das Vehikel darf keine Immunogenität besitzen
6. hohe Sicherheit, um eine direkte pathogene Wirkung des Trägermaterials auszuschließen.

Es gibt zwei Arten von Transportsystemen, virale und nicht-virale Vehikel. Als virale Vehikel, auch Vektor genannt, werden vor allem Retroviren und Adenoviren verwendet. Dabei wird ihre Fähigkeit, Gene in infizierte Wirtszellen einzubringen, genutzt. Um eine hohe Sicherheit des Vektors zu gewährleisten, werden die Gene, die zur Virusvermehrung benötigt werden, durch molekularbiologische Techniken entfernt, sodass der Virus vermehrungsunfähig ist (Verma und Somia 1997). Das gewünschte Gen (zum Beispiel eine RNA) wird in den Virus verpackt, sodass ein rekombinanter Virus entsteht und in die Zelle eingebracht werden kann (Transduktion genannt). Die Vorteile eines viralen Vektors bestehen in einem effizienten Gentransfer, der teilweise vorhandenen Genomintegration und der stabilen Genexpression.

Jedoch haben sie auch einige Nachteile, wie die Gefahr der Mutagenese und Karzinogenese, eine hohe Immunogenität, die aufwendige Produktion, geringe Selektivität und die limitierte Größe des Fremdgens.

2.4.2 Nicht-virale Trägermaterialien

Alternativ zu den viralen Vektoren, haben nicht-virale Vehikel den Vorteil, dass sie kosteneffizient hergestellt werden können, eine hohe Sicherheit bieten, eine geringe Immunogenität besitzen, eine hohe Produktionsausbeute haben und theoretisch unbegrenzt in der Größe des Fremdgens sind. Die Nachteile der nicht-viralen Vehikel sind die transiente Expression, der ineffiziente Gentransfer in den Zellkern, keine Genomintegration und keine vorhandene Selektion.

Wird eine Nukleinsäure durch einen nicht-viralen Vehikel in eine Zelle eingeschleust, spricht man von einer Transfektion. Die gewünschte DNA oder RNA kann dafür mit chemischen Molekülen assoziiert sein (zum Beispiel Liposomen oder Polymere) oder unverpackt („rein“) mit physikalischen Methoden übertragen werden. Wird eine Nukleinsäure „rein“ in einen Muskel oder die Haut appliziert, ist sie nicht vor dem Abbau durch Nukleasen geschützt und gelangt nicht durch die Zellmembranen, wodurch nur eine geringe Genexpression in diesen Geweben festgestellt wird. Beim sogenannten *Gene-Gun* wird die Nukleinsäure in Gold-Komplexe verpackt und mittels Heliumgas durch die Zellmembran in die Zelle „geschossen“ (Robbins und Ghivizzani 1998). Nicht-virale Vehikel können je nach gewünschter Therapie *intravenös* (i.v.), *subkutan* oder *intramuskulär* appliziert werden. Die Aufnahme der nicht-viralen Vehikel erfolgt über Endozytose. Im Jahre 1997 wurde eine einheitliche Nomenklatur für die nicht-viralen Trägermaterialien eingeführt (Felgner et al. 1997). So heißt ein Komplex aus kationischen Lipiden und einem Nukleinsäure-Komplex Lipoplex. Ein Komplex aus kationischem Polymer und einer Nukleinsäure heißt Polyplex. Die jeweilige Transfektion wird als Lipofektion (Nukleinsäuretransfer durch kationische Lipide) beziehungsweise Polyfektion (Nukleinsäuretransfer durch kationische Polymere) bezeichnet. Bei beiden Komplexen handelt es sich dabei um positive Ladungsäquivalente der kationischen Komponente im Verhältnis zur negativen Ladungsäquivalent der Nukleinsäurekomponente.

2.4.2.1 Liposomen

Kationische Lipide bilden auf Grund ihres hydrophilen Kopfes und des hydrophoben Schwanzes im wässrigen Milieu Liposomen. Liposomen können verschieden Substanzen, wie zum Beispiel Nukleinsäuren, im Inneren verpacken (Felgner et al. 1997). Dabei sind sie einfach zu synthetisieren, haben eine geringe Toxizität und eine hohe Variabilität (Größe kann von 30 nm bis 10 000 nm variieren). Da die Liposomen positiv geladen sind, können sie auf Grund elektrostatischer Anziehungskräfte negativ geladene Nukleinsäure im Inneren binden (Abb. 6). Nachdem der Lipoplex durch Endozytose in die Zelle aufgenommen wurde, kommt es zu Wechselwirkungen zwischen den negativ geladenen endosomalen membranständigen Lipiden und den kationischen Lipiden des Lipoplex und somit zur Freisetzung der Nukleinsäure ins Zytoplasma (Felgner et al. 1997). Da die eingeschleuste Nukleinsäure nur extrachromosomal abgelesen wird, ist deren Expression transientser Natur.

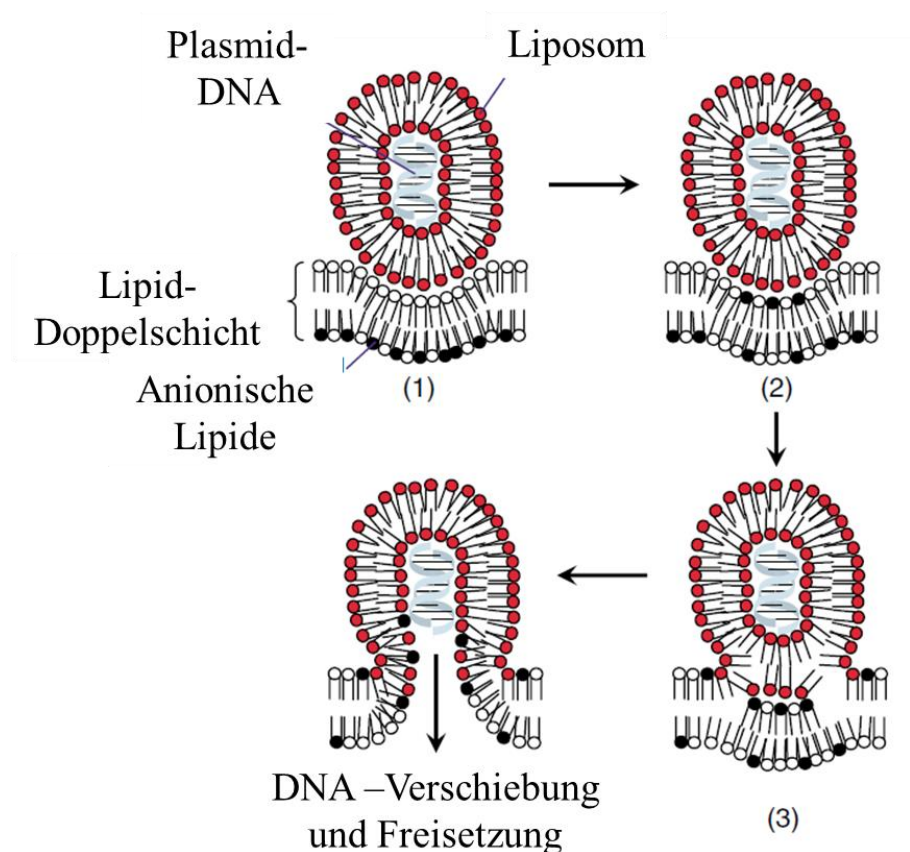


Abb. 6 Mechanismus der liposomalen Zell-Endozytose

1.) Der Lipoplex lagert sich an der Membran an. 2.) Durch diese Anlagerung werden anionische Lipide zum Umklappen in das endosomale Lumen angeregt und die Membran wird dadurch destabilisiert. 3.) Die anionischen Lipide wechseln zu neutralen Ionen-Paaren mit kationischen Lipiden des Lipoplex. 4.) Dadurch wird die DNA ins Zytoplasma freigesetzt. (modifiziert nach Medina-Kauwe et al. 2005)

2.4.2.2 Polyethylenimin (PEI)

Für die kationischen Polymere werden am häufigsten Poly-(L)-Lysin und Polyethylenimin (PEI) verwendet. Auf Grund elektrostatischer Anziehungskräfte können sie negativ geladene Nukleinsäuren im Inneren einlagern und diese somit vor Nukleasen schützen. PEI kann linear oder verzweigt in einer Größe von 1-1000 kDa vorliegen (Boussif et al. 1995). Der Polyplex wird durch Endozytose in die Zelle aufgenommen (siehe Abb. 7). Wenn es innerhalb des Endosoms zur Ansäuerung kommt, kann PEI Protonen aufnehmen, da es unter physiologischem pH-Wert nur partiell protoniert ist. Dem Einstrom von Protonen folgt ein Einstrom von Chloridionen, wodurch das Endosom anschwillt und die Endosomenmembran destabilisiert wird. In Folge dessen kann die Nukleinsäure aus dem Endosom in das Zytoplasma der Zielzelle gelangen (Tiera et al. 2006). Anschließend gelangt die Nukleinsäure zum einen mittels Diffusion durch einen *nuclear pore complex* (NPC) oder zum anderen durch die permeable Zellkernmembran während der Mitose in den Zellkern (Grosse et al. 2006).

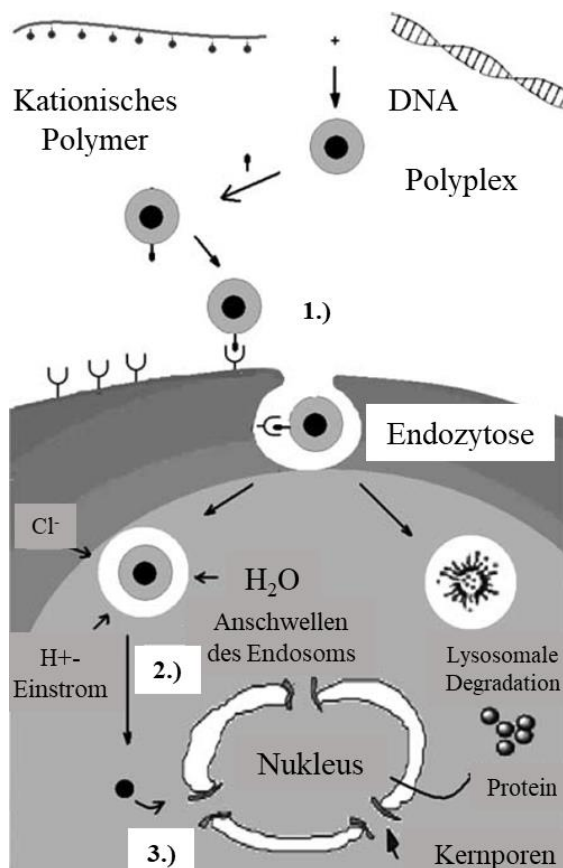


Abb. 7 Mechanismus eines Polymers

1.) Die gewünschte Nukleinsäure wird in ein Polymer verpackt und mittels Endozytose von der Zielzelle aufgenommen. 2.) Durch das Einströmen von H⁺ und Cl⁻ schwillt das Endosom an und die Endosomenmembran wird instabil. 3.) Die Nukleinsäure gelangt nun in den Nukleus und kann exprimiert werden. (modifiziert nach Tiera et al. 2006)

2.5 Viomer

Virale Vektoren werden in einem sehr komplexen und aufwendigen Prozess hergestellt. Dieser Nachteil führte dazu, dass neuartige synthetische Vehikel entwickelt wurden. Diese polykationischen Polymere konnten aufgrund von Wechselwirkungen Nukleinsäuren im Inneren verpacken. Dadurch, dass Serumproteine jedoch polyanionisch sind, kam es zu ungerichteten Wechselwirkungen und der Bildung von Aggregaten (Kircheis et al. 1999). Dadurch war die Verwendung der ersten synthetischen Polymere auf Anwendungen *in vitro* beschränkt. Des Weiteren nahm die Ladungsdichte der eingebauten Polykationen zu, sobald der pH-Wert der Umgebung sank. Dadurch wurde der Transfektionskomplex noch hydrophiler, was den Membranübergang der Nukleinsäure aus einem Endosom heraus und somit die intrazelluläre Abgabe behinderte. Diese synthetischen Polymere wurden von der Firma Lipocalyx GmbH zu neuartigen Polymeren weiterentwickelt, welche unter dem Handelsamen Viomer® vertrieben werden.

2.5.1 Aufbau

Viomere bestehen aus einem polykationischen Kern aus Polyethylenimin, der dicht mit hydrophoben und anionischen Seitenketten substituiert ist. Durch diese nahezu neutrale Oberfläche sind Viomere mit Serum kompatibel und bilden keine unerwünschten Aggregate. Mit Hilfe von Viomeren können in deren Inneren diverse Nukleinsäuren verpackt und nach Applikation durch Endozytose über einen noch unbekannten Rezeptor an der Zelloberfläche aufgenommen werden. Während der Anreicherung der Endosomen am Zellkern kommt es zur Ansäuerung des Komplexes und dadurch zur Freisetzung der enthaltenen Nukleinsäure in das Zytosol (Abb. 8). Dieser Mechanismus wurde von dem Oberflächenprotein Hämagglutinin des Influenza-Virus abgeschaut (persönliche Kommunikation mit Christian Reinsch Lipocalyx GmbH). Beim Kontakt mit einem niedrigen pH-Wert wird dieses Fusionspeptid aufgrund der hydrophoben, anionischen Seitenketten in die Endosomenmembran der Zelle eingebaut. Dadurch können Viomere sehr effektiv dem endozytisch-lysosomalen Abbau entkommen, die gewünschte Nukleinsäure ins Zytosol transportieren und somit einen Einfluss auf die Genexpression ausüben. Viomere wurden auf einer Vielzahl von Zelltypen (unter anderem Primär- und Suspensionszellen) getestet. Dabei wurden die besten Transfektionserfolge bei Monozyten und Makrophagen beobachtet, da diese aufgrund ihrer physiologischen Funktion über eine effiziente Endozytosemaschinerie verfügen (Panzner 2014). In einer Studie von 2015 wurde die Transfektion durch Viomere mit der Transfektion durch Lipofectamine 3000 (herkömmliches kationisches Lipid) verglichen. Dafür wurden diverse Zelllinien mit einem

firefly-Luciferase-mRNA enthaltenen Viomer bzw. Lipofectamine 3000 transfiziert und nach 24h die Biolumineszenz der Zellen analysiert. Bei dieser Analyse wurde ein *Beetle Lysis Juice* zu der Luciferase-haltigen Probe hinzugegeben. Das in dem *Juice* enthaltene Luciferin diente der in der Probe enthaltenen Luciferase als Substrat, bei dessen Umsetzung eine messbare Biolumineszenz auftrat. Die Viomer-transfizierten Zellen wiesen ein 2- bis 10-fach höheres Expressionsniveau von Luciferase auf als die mit Lipofectamin 3000 transfizierten Zellen (Rao et al. 2015). Dies wies darauf hin, dass die Genexpression beziehungsweise Gentransfektion mit dem Viomer signifikant verbessert werden konnte.

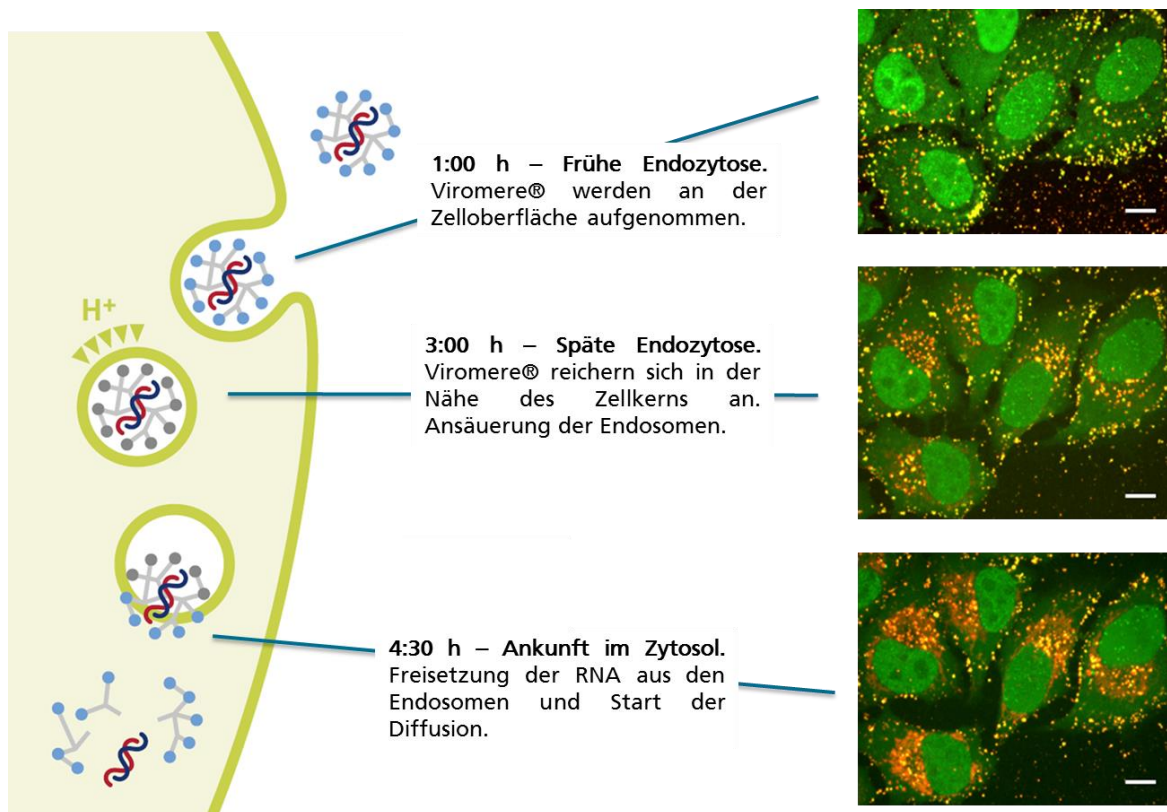


Abb. 8 Darstellung der Funktionsweise eines Viomers

Viomere werden durch Endozytose an der Zelloberfläche aufgenommen. Nach Ansäuerung des Endosoms kommt es zur Freisetzung der verpackten Nukleinsäure ins Zytosol. (modifiziert nach Lipocalyx GmbH 2017)

2.6 Beeinflussung von Entzündungsreaktionen durch CCL2- und TNF- α -Antagonismus

2.6.1 Beeinflussung von CCL2 mittels 7ND

7ND ist ein gentechnisch modifiziertes CCL2-Molekül, dem die Aminosäuren 2-8 fehlen. 7ND ist trotz des veränderten N-terminalen Endes in der Lage mit nativen CCL2-Molekülen ein Heterodimer zu bilden und als Monomer an den CCR2 zu binden (Zhang et al. 1994). Der CCR2 wird jedoch nur von N-terminal intaktem CCL2 aktiviert (Zhang und Rollins 1995). Somit wird der Rezeptor durch die Bindung von 7ND-CCL2 blockiert. Dadurch agiert 7ND als

ein CCL2-Antagonist. Ohne die Aktivierung von CCR2 ist die Chemotaxis von Monozyten unterdrückt und es kommt in chronischen Erkrankungen zur Reduktion der Entzündungsreaktion. Auf Grund seiner Funktionsweise ist 7ND daher von Interesse für die Wirkstoffforschung auf dem Gebiet der Entzündungserkrankungen. In verschiedenen Studien wurde belegt, dass die chemotaktische Wirkung von CCL2 auf Monozyten eine entscheidende Rolle bei der Erzeugung von ZNS-Entzündungsreaktionen spielt (Huang et al. 2001). In einem Versuch aus dem Jahr 2008 wurde 7ND in ein Plasmid kloniert und *intramuskulär* appliziert, um eine Expression im Krankheitsmodell zu induzieren und somit Monozytenmigration zu inhibieren. Dabei diente das Tiermodell der experimentellen Autoimmun-Enzephalomyelitis (EAE) als Äquivalent zur Erforschung der humanen Multiplen Sklerose. Die Versuchstiere erhielten bis 21 Tage nach der Immunisierung dreimal wöchentlich eine Injektion mit 100µg 7ND-Plasmid. Anschließend wurden verschiedene neuronale Gewebe histologisch auf inflammatorische Läsionen untersucht, sowie ein klinischer Score beurteilt. Die klinischen Anzeichen einer akuten EAE wurden durch die Applikation von 7ND minimal reduziert. Jedoch konnten die klinischen Anzeichen einer chronischen EAE durch die Applikation von 7ND vollständig supprimiert werden. In beiden Verlaufsformen der EAE war die Anzahl der in das zentrale Nervensystem infiltrierenden Monozyten nach der Applikation von 7ND reduziert (Park et al. 2008).

In dem Modell der *murinen* autoimmunen Myokarditis konnte gezeigt werden, dass CCL2 durch die Steigerung der IFN- γ - und IL-6-Konzentration eine Entzündungsreaktion in den Kardiomyozyten auslöst (Damås et al. 2001). In einem Versuch aus dem Jahr 2011 wurde durch die Applikation von *cardiac Troponin* eine Myokarditis induziert. Zwei Wochen später wurde 7ND in einen Adeno-assoziierten-Virus (AAV) verpackt und i.v. in die Schwanzvene appliziert. 28 Tage später wurde das Herz histologisch untersucht und eine Analyse der Zytokin-Konzentrationen in der Milz durchgeführt. Es wurde festgestellt, dass die Applikation von 7ND zu einer signifikanten Reduktion der TNF- α -Konzentration, sowie zu einer Tendenz der Reduktion von IL-1 β , IL-4 und IL-13 führte. Bei der histologischen Untersuchung des Myokards konnte festgestellt werden, dass durch die Applikation von 7ND eine Reduktion der inflammatorischen Infiltrate und eine Reduktion der Fibrose erreicht wurde (Kaya et al. 2011). CCL2 ist durch die Rekrutierung von Monozyten in die Arterienwände auch an der Pathogenese verschiedener *vaskulärer* Erkrankungen beteiligt (Egashira 2003). Um die humane *Atherosklerose* zu erforschen, wird ein Mausstamm verwendet, dem das Apolipoprotein E fehlt, welches eine wichtige Rolle im Fettstoffwechsel spielt. Durch das Fehlen dieses Proteins, entwickeln die Tiere spontan *atherosklerotische* Läsionen, die mit denen der humanen

Atherosklerose vergleichbar sind und so deren Pathogenese studiert werden kann. 7ND wurde auch hier in ein Plasmid kloniert und *intramuskulär* appliziert. Da die Versuchstiere erst 7-8 Wochen alt waren, zeigten die Gefäße zum Zeitpunkt der 7ND-Applikation noch keine *atherosklerotischen* Läsionen. Nach einer cholesterinreichen Diät wurde die Aorta entnommen und histologisch untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass die Applikation von 7ND die Entwicklung der *atherosklerotischen* Läsionen reduzierte (Kitamoto und Egashira 2002; Zhang und Rollins 1995; Egashira 2003). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine 7ND-Applikation, nach einer Stent-Implantation in die *atherosklerotische* Aorta eines hypercholesterinämischen Kaninchens, die Monozyteninfiltration in das arterielle Endothel hemmte und somit die Entstehung einer *in-stent-Restenose* hemmte (Egashira 2003).

2.6.2 Beeinflussung von TNF- α mittels Gentherapie

Wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben, ist TNF- α durch die Aktivierung des TNF-RI an vielen inflammatorischen Erkrankungen beteiligt. In der rheumatoiden Arthritis induziert TNF- α die Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen, welche an der Rekrutierung von Leukozyten in das entzündete Gewebe beteiligt sind. Außerdem stimuliert TNF- α die Ausschüttung weiterer Zytokine und Chemokine (Moreland et al. 1997). Die TNF- α -Konzentration ist in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis erhöht und es konnte in vergangenen Studien belegt werden, dass eine Applikation von TNF- α -Antagonisten die klinischen Symptome einer rheumatoiden Arthritis reduzierten (Brennan et al. 1989). Ein solcher Antagonist ist zum Beispiel Etanercept, welches im Jahr 2000 als einer der ersten TNF- α -Inhibitoren unter dem Namen Enbrel® in der Europäischen Union als Medikament für die Behandlung der rheumatoiden Arthritis zugelassen wurde (Hassett et al. 2018). Etanercept wird in Ovarialzellen aus chinesischen Hamstern (CHO-Zellen) synthetisiert, besteht aus 934 Aminosäuren und hat eine Molekülmasse von 150 kDa. Es ist ein Fusionsprotein, welches aus der löslichen Ligandenbindungsdomäne des humanen TNF-RII und der Fc-Untereinheit des humanen IgG1 besteht (TNFR:Fc). Dieses Dimer ist in der Lage TNF- α zu neutralisieren, wodurch dieses nicht mehr an den membrangebundenen TNFR bindet und dadurch die biologische Wirkung (zum Beispiel die chemotaktische Aktivität) von TNF- α gehemmt wird. In einer Studie von 1999 konnte belegt werden, dass die Applikation von TNFR:Fc zu einer Reduktion der klinischen Symptome (Schmerzen, morgendliche Steifheit der Gelenke) und der Anzahl der geschwollenen Gelenke führte (Moreland et al. 1999).

2.7 Thioglykolat-induzierte Peritonitis

Für die Testung des Viomer-Nukleinsäure-Komplex wurde ein Tiermodell benötigt, in dem die Infiltration von Monozyten im Bereich einer lokalen Entzündung analysiert werden konnte. Daher wurde das Modell der Thioglykolat-induzierten Peritonitis gewählt. Das *Peritoneum* (Bauchfell) ist eine glatte, durchsichtige, seröse Haut, die auf den intraabdominalen Organen liegt und den Bauchraum auskleidet. Es ist von vielen Blutgefäßen, Lymphgefäßen und Nervenfasern durchzogen und dient neben dem Schutz der Organe auch der Immunabwehr. Die mit dem Bauchfell ausgekleidete Bauchhöhle beinhaltet beim Menschen unter physiologischen Umständen weniger als 100 ml seröse Flüssigkeit, bestehend aus einem Ultrafiltrat aus Plasma, mit einer Proteinkonzentration von < 3 g/dl (Heel und Hall 1996). Das *Peritoneum* besteht aus einem einschichtigen *Mesothel*, welches durch zahlreiche Poren mit den *submesothelialen* Lymphbahnen in Verbindung steht. Das *Peritoneum* enthält Monozyten, Granulozyten und Makrophagen, die nach ihrer Aktivierung durch diverse *Noxen* (zum Beispiel während einer *intraabdominalen* Infektion oder einer Perforation *intraabdominaler* Organe) inflammatorische Mediatoren ausschütten. Diese Mediatoren (zum Beispiel Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF- α) können unter anderem das Komplementsystem aktivieren, wodurch C3a und C5a die Chemotaxis von Monozyten und neutrophilen Granulozyten und die Degranulation von basophilen Granulozyten und Mastzellen stimulieren. Die Degranulation der Mastzellen führt zur Ausschüttung von vasoaktiven Substanzen (steigern die Gefäßpermeabilität), Komplementfaktoren (führen zur Chemotaxis von Monozyten) und Opsoninen (steigern Phagozytose durch Opsonierung von Bakterien) (Heel und Hall 1996). All diese Prozesse führen zu einer Entzündung des *Peritoneums*, Peritonitis genannt. Das zur humanen Peritonitis äquivalente Tiermodell der Thioglykolat-induzierten Peritonitis wurde 1964 zum ersten Mal beschrieben. Thioglykolat ist das Salz der Mercaptoessigsäure und wurde zur Durchführung von Sterilitätstests entwickelt (Li et al. 1997). In einer Studie wurde jedoch entdeckt, dass es ein nützliches entzündungsinduzierendes Mittel war, um Makrophagen aus dem *Peritoneum* zu gewinnen (Gallily et al. 1964). In Studien von 2011 und 2013 wurde gezeigt, dass während einer Thioglykolat-induzierten Peritonitis unter anderem die CCL2- und TNF- α -Konzentrationen auf Grund der ausgelösten Inflammation erhöht waren (Cynis et al. 2011; Lam et al. 2013).

2.8 Ziele der Arbeit

Entzündungserkrankungen sind sowohl in der Humanmedizin als auch in der Veterinärmedizin weit verbreitet und weisen verschiedenste Ätiologien und Pathophysiologien auf. Ihnen gemeinsam ist die Aktivierung diverser Entzündungskaskaden, die unter anderem durch Zytokine und Chemokine aktiviert werden.

Durch das Einschleusen von Genen könnten typische Entzündungsmediatoren, wie zum Beispiel CCL2 und TNF- α , ohne aufwendige und kostenintensive Herstellungsprozesse gezielt beeinflusst werden. Aufgrund des fehlenden Trägersystems für den Transport von genetischem Material existiert ein fundamentaler Bedarf an solchen Trägermaterialien und Viromere stellen diesbezüglich einen sehr aussichtsreichen Lösungsansatz dar. In dieser Arbeit sollte die grundlegende Frage geklärt werden, ob Viromere als neuartige Trägersysteme in der Gentherapie eingesetzt werden können. Ziel war es, ausgewählte Nukleinsäuren in den Viromeren zu verpacken und zu applizieren, um die Infiltration der Monozyten in das entzündete Gewebe und somit die Entstehung einer Entzündungsreaktion zu hemmen.

Daraus ergaben sich folgende Ziele der Arbeit:

- Die Etablierung des in der Literatur beschriebenen Entzündungsmodells der Thioglykolat-induzierten Peritonitis in der Maus.
- Die Charakterisierung zweier potentieller Viromer-Nukleinsäure-Komplexe zur Hemmung der Entzündungsmediatoren CCL2 und TNF- α , sowie die Bestimmung deren Verteilung im Organismus.
- Behandlungsversuche mit CCL2- bzw. TNF- α -antagonisierenden mRNAs, zur Beurteilung von deren Behandlungseffekten und somit der Eignung der Viromere als Trägersysteme für die Gentherapie.

3 Tiere, Material und Methoden

3.1 Materialien

Alle verwendeten Chemikalien, Materialien und Geräte befinden sich im Anhang unter 10.1.

3.2 Versuchstiere

Für alle Versuche wurden männliche Mäuse des Stammes DBA/1 vom Versuchstierzüchter Janvier Labs verwendet. Jungadulte Tiere ab einem Alter von 8 Wochen bis maximal 30 Wochen wurden für die Versuche verwendet.

Alle durchgeführten Versuche wurden von der zuständigen Behörde (Landesverwaltungsamt Sachsen-Anhalt) mit der Tierversuchsnummer 42502-2-1472 MLU genehmigt.

3.2.1 Haltungsbedingungen

Während der gesamten Versuchsdauer wurden die Mäuse in einzelbelüfteten Käfigen (IVC Typ II, lang von Tecniplast) zu je 5 Mäusen pro Käfig gehalten. Die standardisierten Haltungsbedingungen (Raumtemperatur: $22\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$; Luftfeuchtigkeit: $50\% \pm 20\%$) wurden von einer zentralen Lüftungsanlage geregelt (GV-SOLAS 2014). Die Regulierung des Tag-Nacht-Rhythmus (12 Stunden Tag / 12 Stunden Nacht) erfolgte über eine Zeitschaltuhr. Den Tieren stand Standard-Maus-Futter (ssniff: Maus-Zucht) und Leitungswasser mit Trinkwasserqualität *ad libitum* zur Verfügung.

3.2.2 Allgemeiner Aufbau der Tierversuche

3.2.2.1 Biodistribution

Im ersten Versuchsabschnitt wurde die biologische Verteilung der transfizierten mRNA von 7ND und einer Luciferase ermittelt. Den Versuchstieren wurde ein Viomer-Nukleinsäure-Komplex appliziert. An zwei verschiedenen Zeitpunkten nach der Applikation wurden die Tiere getötet und Blut, Knochenmark, Milz, Leber und eine *Peritoneallavage* analysiert. Die Lumineszenz wurde mit Hilfe des Glomax *Plate-Reader* analysiert.

3.2.2.2 Thioglykolat-induzierte Peritonitis

Im zweiten Versuchsabschnitt wurde den Tieren ein Viomer-Nukleinsäure-Komplex appliziert und danach durch *intraperitoneale* (i.p.) Applikation einer 8 %igen Thioglykolat-Lösung eine Peritonitis ausgelöst. Nach 4 Stunden wurde bei den Tieren eine *Peritoneallavage* durchgeführt und diese mittels Durchflusszytometrie analysiert.

3.3 Viomer und mRNA-Präparationen

Für Transfektionsversuche von RAW 246.7-Zellen mit einem Viomer-Nukleinsäure-Komplex wurde Viomer-RED verwendet. Die Transfektion erfolgte nach Herstellerangaben (siehe 3.4.1.1).

Für die Tierversuche wurde das sich im Entwicklungsprozess befindliche Viomer-IN VIVO von der Lipocalyx GmbH zur Verfügung gestellt. Die jeweilige mRNA-Stammlösung (7ND-mRNA: 1,21 mg/ml; sTNF-RII-mRNA: 1,43 mg/ml; FLuc-mRNA: 1 mg/ml) wurde mit Ribonuklease (RNase)-freiem Wasser auf 400 µg/ml verdünnt. Das als Lyophilisat vorliegende Viomer-IN VIVO wurde jeweils mit der verdünnten mRNA-Stammlösung rehydriert, so dass im finalen Ansatz eine Viomer-Konzentration von 4 mM vorlag. Pro Maus wurden 60 µg mRNA (je nach Versuchsabschnitt 7ND-/sTNF-RII- oder FLuc-mRNA) beziehungsweise 150 µl Viomer-Nukleinsäure-Komplex appliziert.

3.3.1 Verwendete mRNA

Die für den Versuch verwendete mRNA wurde von TriLink Biotechnologies synthetisiert. Die mRNA für die humane sTNF-RII-mRNA bestand aus 1050 Nukleotiden, die *murine* 7ND-mRNA aus 702 Nukleotiden und die *firefly*-Luciferase-mRNA (FLuc) aus 1921 Nukleotiden. Alle mRNAs verfügten über einen Poly-A-Schwanz und eine 5'-Cap-Struktur um die Stabilität und den Transport der mRNA zu verbessern.

3.4 Versuchsaufbau

3.4.1 Proof of Concept mittels Zellkultur

3.4.1.1 Transfektionsversuch in RAW 264.7-Zellen

Die Versuche in der Zellkultur wurden in RAW 246.7-Zellen durchgeführt. Es wurden zwei separate Versuche durchgeführt, bei denen jeweils nur ein Viomer-Nukleinsäure-Komplex (entweder mit 7ND-mRNA oder sTNF-RII-mRNA) transfiziert wurde.

Für die Transfektion wurden zunächst 4×10^6 Zellen in 15 ml Zellkulturmedium (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* [DMEM] mit 10 % fötalem bovinem Serum [FBS]) in eine 75 cm² Zellkulturflasche eingesät und 48 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden nach der Inkubationsphase mit 3 ml Trypsin-EDTA-Lösung (0,05 % Trypsin; 0,02 % EDTA) von der Oberfläche der Zellkulturplatte gelöst. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 7 ml Zellkulturmedium abgestoppt und die Zellsuspension durch Zentrifugation (3 Minuten, 300 × g) pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Zellpellet in 5 ml Zellkulturmedium resuspendiert und die Zellzahl mit Hilfe eines Zellzählers (Casy - Model DT)

bestimmt (Größenbereich für tote Zellen: 4,0 bis 7,0 μm). Es wurden 5×10^4 lebende Zellen pro *Well* in 100 μl Zellkulturmedium in eine 96-*Well*-Zellkulturplatte eingesät und für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Zur Vorbereitung der Transfektion wurde die 7ND- beziehungsweise sTNF-RII-mRNA-Lösung hergestellt. Hierzu wurde die entsprechende mRNA-Stammlösung (7ND-mRNA: 1,21 mg/ml; sTNF-RII-mRNA: 1,43 mg/ml) auf 11 ng/ μl in Viomer-RED-Puffer verdünnt. Für die Viomerlösung wurde in einem separaten 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß pro eingesätem *Well* 0,04 μl Viomer-RED vorgelegt, 0,96 μl Viomer-RED-Puffer hinzugegeben und für 5 Sekunden mittels Vortex homogenisiert. Um den Viomer-mRNA-Komplex zu bilden, wurden 45 μl der mRNA-Verdünnung mit 5 μl der Viomer-Lösung vermischt, homogenisiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden 10 μl des Viomer-mRNA-Komplexes je *Well* zu den Zellen gegeben. Die Zellkulturüberstände wurden nach 6, 24 und 30 Stunden abgenommen und bei -20 °C für die späteren ELISA-Analysen gelagert.

3.4.1.2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Ein *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) ermöglicht die Bestimmung der Konzentration von Antigenen oder Antikörpern. In den folgenden Versuchsabschnitten wurden *Sandwich*-ELISA durchgeführt. Dabei wurde jeweils eine 96-*Well*-Mikrotiterplatte verwendet, wobei in jedem *Well* ein Fangantikörper vorlag, der den gewünschten Biomarker während der Inkubation aus einer Probe gebunden hat. Daraufhin wurde ein primärer Detektionsantikörper hinzugegeben, welcher ebenfalls an den Biomarker gebunden hat und mit Hilfe eines sekundären Antikörpers, der an die Fc -Region des primären Antikörpers bindet, detektiert werden konnte. Durch ein an den sekundären Antikörper konjugiertes Enzym wurde eine Farbreaktion katalysiert, wodurch es zu einem Farbumschlag im Ansatz kam. Diese Reaktion wurde nach einer definierten Zeitspanne abgebrochen und die Absorption photometrisch bestimmt.

CCL2- ELISA

Für diesen Versuch wurden die Zellkulturüberstände aus dem Transfektionsversuch verwendet, bei dem die RAW-Zellen mit einem Viomer-7ND-mRNA-Komplex transfiziert wurden (siehe 3.4.1.1). Für die Bestimmung der 7ND-Konzentration wurde ein kommerziell erhältlicher CCL2-ELISA verwendet, da mit diesem auch 7ND detektiert werden konnte. Der verwendete Maus CCL2-Platinum ELISA wurde nach der vorliegenden Anleitung (Invitrogen) durchgeführt. Zur Erstellung einer Kalibrier-Kurve wurde eine CCL2-Standard-Proteinlösung

in einem Konzentrationsbereich von 1000 pg/ml bis 15,6 pg/ml 1:2 verdünnt, wovon jeweils 100 µl/*Well* eingesetzt wurden. Da die Menge des Produkts aus der katalysierten Farbreaktion der *horse raddish peroxidase* (HRP) proportional zur enthaltenen CCL2-/7ND-Konzentration im Ansatz ist, ließen sich mit Hilfe dieser Kalibrier-Kurve die Konzentrationen des enthaltenen CCL2/7ND in den Proben bestimmen. Die Absorptionsmessung erfolgte am *Plate-Reader* Spectra-Fluor Plus bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 570 nm mit Hilfe der Gerätesoftware XFluor4.

sTNF-RII-ELISA

Für die Analyse der sTNF-RII-Konzentration wurden die Zellkulturüberstände aus dem Transfektionsversuch verwendet, bei dem die RAW-Zellen mit einem Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplex transfiziert wurden (siehe 3.4.1.1).

Der verwendete Maus sTNF-RII-ELISA wurde nach der vorliegenden Anleitung (RayBiotech) durchgeführt. Um eine Kalibrier-Kurve zu erstellen, wurde eine sTNF-RII-Standard-Proteinlösung in einem Konzentrationsbereich von 2000 pg/ml bis 2,74 pg/ml 1:3 verdünnt, wovon jeweils 100 µl/*Well* eingesetzt wurden. Mit Hilfe dieser Kalibrier-Kurve ließen sich die Konzentrationen des enthaltenen sTNF-RII in den Proben bestimmen, da die Menge des Produkts aus der katalysierten Farbreaktion der HRP proportional zur enthaltenen sTNF-RII-Konzentration im Ansatz ist. Die Absorptionsmessung erfolgte wieder am *Plate-Reader* Spectra-Fluor Plus bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 570 nm mit Hilfe der Gerätesoftware XFluor4.

3.4.2 Etablierung Thioglykolat-induzierte Peritonitis

3.4.2.1 Herstellung Thioglykolat

Für die Induktion einer Thioglykolat-induzierten Peritonitis wurde eine 8 %ige Thioglykolat-Lösung hergestellt. Dafür wurden 8 g Thioglykolat in 100 ml einer 0,9%igen Natrium-Chlorid-Lösung (NaCl) resuspendiert. Die Suspension wurde in ein autoklavierbares Behältnis umgefüllt und bei 122°C für 40 Minuten autoklaviert, um das Thioglykolat-Pulver zu lösen. Nach dem Autoklavieren wurde die Thioglykolat-Lösung bei 8 °C gelagert.

3.4.2.2 Versuchsaufbau

Für die Etablierung der Thioglykolat-induzierten Peritonitis wurden die Versuchstiere in 2 Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe erhielt eine i.p.-Applikation mit 2 g Thioglykolat/kg Körpergewicht (KGW), dazu wurde ein entsprechendes Volumen einer

8 %igen Thioglykolat-Lösung injiziert. Die andere Gruppe erhielt eine i.p.-Applikation mit volumenäquivalenter steriler Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS).

Vier Stunden nach der Applikation wurden die Tiere mit Isofluran narkotisiert, eine *Peritoneallavage* durchgeführt und Leber, Milz und Knochenmark entnommen. Die in der Lavageflüssigkeit enthaltenen Zellen wurden anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert, um die eingewanderten Monozyten zu quantifizieren (siehe Abb. 9).

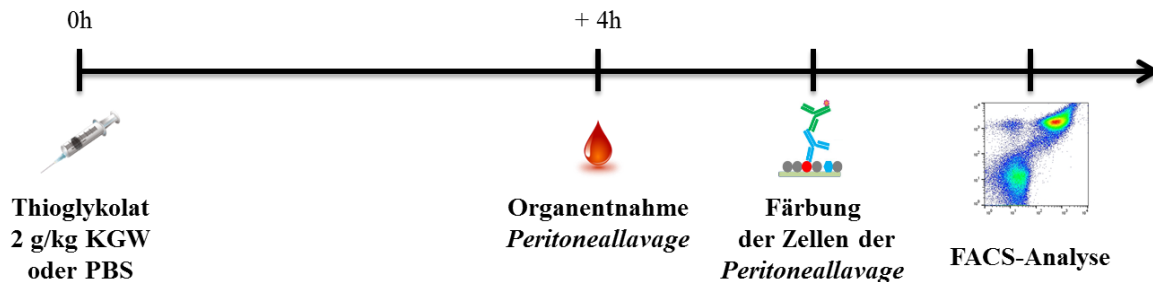


Abb. 9 Versuchsaufbau Etablierung Thioglykolat-induzierte Peritonitis

Die Applikation von Thioglykolat (2 g/kg KGW) erfolgte i.p. Nach 4 Stunden wurde mit 8 ml PBS eine *Peritoneallavage* durchgeführt und diese im Anschluss mittels Durchflusszytometrie analysiert.

3.4.2.3 Organentnahme/ *Peritoneallavage*

Für die Durchführung der *Peritoneallavage* wurden die Tiere mit 3,5 % Isofluran narkotisiert und 8 ml PBS i.p. appliziert. Durch eine anschließende Bauchmassage verteilte sich das PBS gleichmäßig im Abdomen und es konnten ca. 4-5 ml Lavageflüssigkeit aspiriert und in ein 15 ml Falcon-Gefäß überführt werden.

Die schmerzfreie Tötung der Tiere erfolgte im Anschluss an die *Peritoneallavage* mittels Entblutens durch Herzpunktion. Die so gewonnenen Blutproben wurden in ein Lithium-Heparin-Röhrchen überführt und für 10 Minuten mit $2000 \times g$ bei 4°C zentrifugiert. Danach wurde das Plasma in ein 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, auf Trockeneis schockgefroren und bei -80°C gelagert. Für die Knochenmarkentnahme wurden beide Hinterbeine abgesetzt und nach der Durchtrennung des Femurs und der Tibia die *Ossa femora* entnommen. Die so geöffnete Knochenmarkhöhle wurde mit einer 23 G Kanüle punktiert und das Knochenmark mit 1 ml eiskalten *Hank's balanced salt solution* (HBSS) ausgespült und in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß aufgefangen. Die Knochenmark-Proben wurden mit $400 \times g$ für 5 Minuten zentrifugiert. Der Zellüberstand wurde verworfen, das Zellpellet auf Trockeneis schockgefrostet und bei -80°C gelagert. Für verschiedene nachfolgende Untersuchungen mussten diverse Organe frei von Blutrückständen sein, sodass eine Perfusion des Blutkreislaufs durchgeführt wurde. Dafür wurde nach der Blutentnahme eine stumpfe 21 G Kanüle durch die rechte Herzkammer in die Aorta eingeführt und die Blutgefäße mit 20 ml PBS perfundiert. Anschließend konnten die Milz und der *Lobus hepatis dexter* der Leber

am jeweiligen Hilus abgesetzt, in ein leeres 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und auf Trockeneis schockgefrostet werden. Die Lagerung der Organe erfolgte bei -80 °C.

3.4.2.4 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können heterogene Zellsuspensionen auf einzelne Bestandteile hin quantifiziert und profiliert werden (*fluorescence-activated cell scanning* = FACS). Bei Einlegen einer Probe in das Gerät werden darin befindliche Zellen mit einem Flüssigkeitsstrom (*sheath fluid*) aufgenommen und durch hydrodynamische Fokussierung in der Messzelle zentriert. In dieser Messzelle passiert jede einzelne Zelle einen Laserstrahl. Dabei wird das vom Laser ausgesandte Licht durch die Zelloberfläche in derselben Achse gestreut und von einem *Forward Scatter Detector* (FSC) registriert. Die Signalintensitäten sind dabei proportional zu der Größe der passierenden Zelle. Des Weiteren wird das Licht des Lasers durch die Strukturen im Zellinneren (abhängig von der Granularität der Zelle) gestreut. Das Streulicht, was dabei in einem 90°-Winkel gestreut wird, misst ein *Sideward Scatter Detektor* (SSC). Zusätzlich sind verschiedene Fluoreszenzdetektoren verbaut, mit deren Hilfe sich verwendete Fluorochrome analysieren lassen. Dazu reflektieren unterschiedliche dichroitische Spiegel das Streulicht in Abhängigkeit von der Wellenlänge auf die verschiedenen Detektoren. Der FL1-Detektor erfasst Licht mit einer Wellenlänge von 530 nm, der FL2-Detektor Licht mit 585 nm, der FL3-Detektor Licht mit >650 nm und der FL4-Detektor Licht mit 661 nm (Holmes et al. 2002).

Verwendete Antikörper

Um eine unspezifische Bindung der verwendeten Antikörper an die Zelloberflächen zu verhindern, wurden alle Proben mit einem CD16/CD32 *F_c-Blocker* inkubiert. Als Isotyp-Kontrollen dienten Ratten-Immunglobulin G, Subtyp 2a (IgG2a), konjugiert mit Alexa-Fluor 647 bzw. PerCP-Vio 700. Es wurden zwei verschiedene fluoreszenzmarkierte Antikörper verwendet, um die in das *Peritoneum* eingewanderten Zellen zu quantifizieren. Ly-6B.2 bindet spezifisch an Monozyten und neutrophile Granulozyten. Dieser Antikörper lag konjugiert mit Alexa-Fluor 647 vor und konnte entsprechend mit dem FL4-Detektor analysiert werden. Ly-6G bindet spezifisch an neutrophile Granulozyten und lag konjugiert mit PerCP-Vio700 vor, sodass entsprechend markierte Zellen mit dem FL3-Detektor analysiert werden konnten (Cynis et al. 2011). Für die Versuche zur Etablierung der Thioglykolat-induzierten Peritonitis wurden die oben genannten Antikörper mit folgenden Farbkonjugierungen angewandt: Ly-6G:APC (FL4) und Ly-6B.2:FITC (FL1).

Probenaufbereitung

Die Aufbereitung der Proben erfolgte angelehnt an die Herstellerangaben der verschiedenen Antikörper. Die *Peritoneallavage* (siehe 3.4.2.3) wurde mit $300 \times g$ für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde für spätere FACS-Analysen zu jeweils 20 μl beziehungsweise 1 ml aliquotiert, auf Trockeneis schockgefrostet und bei $-80^\circ C$ gelagert. Zu den erythrozytenhaltigen Zellpellets wurden 10 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer (siehe Tab. 4) hinzugegeben, um die roten Blutkörperchen zu lysieren, da sich in Vorversuchen herausgestellt hat, dass diese die FACS-Analyse beeinträchtigen. Im Anschluss an eine Zentrifugation bei $400 \times g$ für 5 Minuten wurden die Zellpellets mit 10 ml PBS gewaschen und erneut bei $400 \times g$ für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml FACS-Puffer (PBS + 3 % FBS) resuspendiert. Von jeder Lavageprobe wurden jeweils 100 μl des resuspendierten Zellpellets in drei FACS-Röhrchen überführt. Zu allen FACS-Röhrchen wurde anschließend 1 μl des *F_c-Blockers* CD16/CD32 hinzugegeben und für 10 Minuten bei $4^\circ C$ im Dunkeln inkubiert. Zu dem ersten FACS-Röhrchen wurden keine Antikörper hinzugegeben, weshalb es als Negativ-Kontrolle diente. In das zweite FACS-Röhrchen wurden jeweils 10 μl Ratten IgG2a:PerCP-Vio 700 und Ratten IgG2a:Alexa-Fluor 647 hinzugegeben, es diente der Kontrolle auf unspezifische Bindungen. Jeweils 10 μl der Antikörper Ly-6G:PerCP-Vio 700 und Ly-6B.2:Alexa-Fluor 647 wurden in das dritte FACS-Röhrchen gegeben. Alle FACS-Röhrchen wurden für 10 Minuten bei $4^\circ C$ im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubationszeit erfolgte ein Waschschriff mit 1 ml PBS und anschließender Zentrifugation bei $400 \times g$ für 5 Minuten. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 200 μl FACS-Puffer resuspendiert. Nachfolgend wurden die Zellen in einem Gesamtvolumen von 200 μl FACS-Puffer in ein *Counting-Beads* enthaltendes Trucount™-Röhrchen überführt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Vor der Durchflusszytometrie-Analyse wurden die Zellen und *Beads* mittels Vortex vereinzelt.

Probenanalyse

Am FACS-Calibur wurde das Programm Cell Quest Pro verwendet. Es wurden 3 Detektionsfenster eingerichtet (siehe Abb. 10)

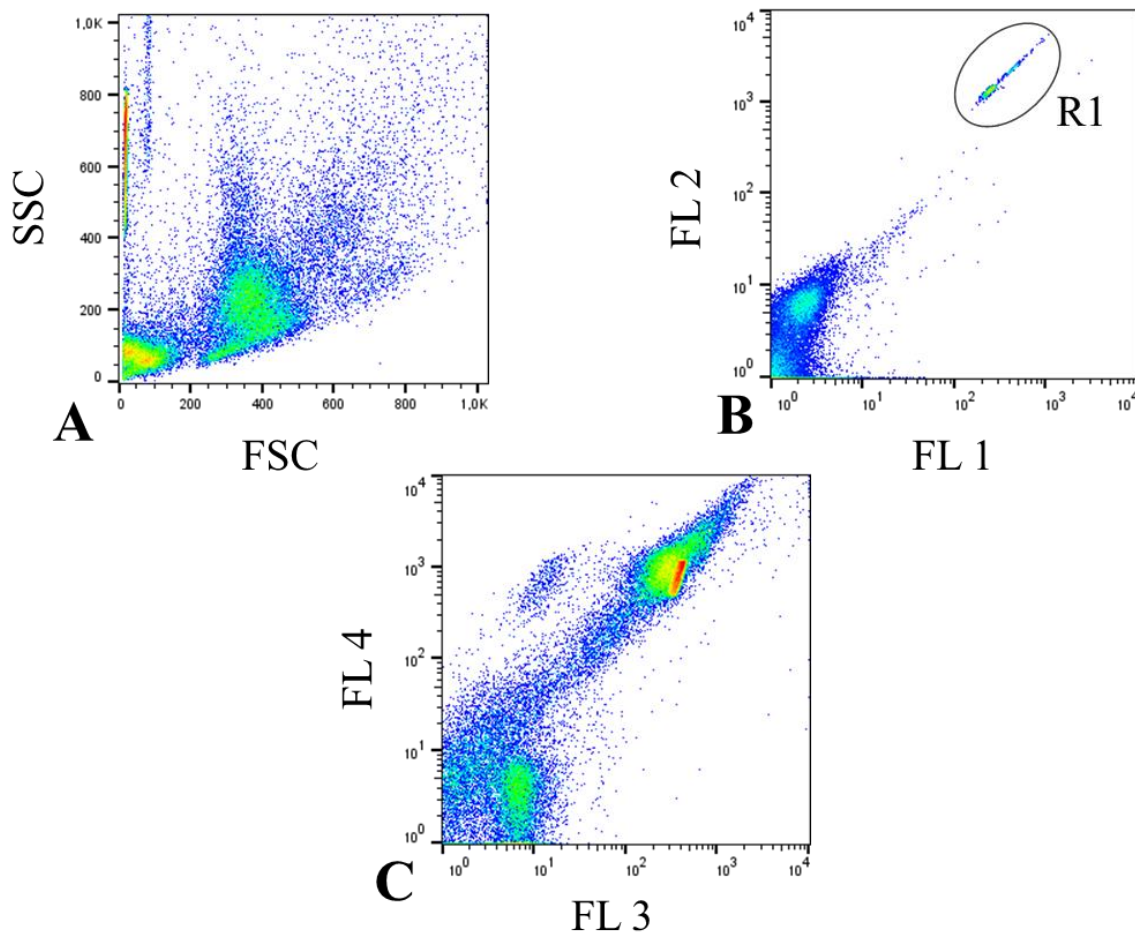


Abb. 10 Einstellen der Detektionsfenster (FACS-Analyse)

A: *Sideward Scatter* gegen *Forward Scatter*, zeigt die Zellen sortiert nach Größe und Granularität; B: FL2 gegen FL1, R1 stellt die Region dar, in der die *Beads* der Trucount™-Röhrchen erschienen. C: FL4 gegen FL3. Darstellung der fluoreszierenden Antikörper Ly-6B.2:Alexa-Fluor 647 in FL4 gegen Ly-6G:PerCP-Vio 700 in FL3.

Da sich in dem Detektionsfenster der Antikörper (FL4 gegen FL3) die Fluoreszenz der Antikörper und der *Beads* überlagerten, wurde das Detektionsfenster FL2 gegen FL1 erstellt, um die *Beads* der Trucount™-Röhrchen quantifizieren zu können. Jede Analyse wurde automatisch beendet, nachdem im Detektionsfenster FL2 gegen FL1 in der Region R1 10.000 *Beads* gezählt wurden. Dadurch waren alle Messungen untereinander vergleichbar und die Monozyten konnten quantifiziert werden.

Datenauswertung

Mit dem Computerprogramm FlowJo (FlowJo LLC) wurden die Messwerte der FACS-Analyse ausgewertet und die Monozyten quantifiziert. Dafür wurde der entsprechende Datensatz mit FlowJo geöffnet und die Signale der Detektoren FL4 und FL3 gegenübergestellt. Der Antikörper Ly-6B.2 bindet spezifisch an Monozyten und Granulozyten, wodurch beide Populationen durch das fluoreszierende Alexa-Fluor 647 vom FL4-Detektor erfasst wurden. Somit erschienen beide Populationen im oberen linken Quadranten der FlowJo-Grafik. Ly-6G bindet spezifisch an die neutrophilen Granulozyten, wodurch diese durch das fluoreszierende PerCP-Vio700 vom FL3-Detektor erfasst wurden. Somit erschien diese Population im unteren rechten Quadranten der FlowJo-Grafik. Da aber die Granulozyten sowohl von Ly-6B.2 als auch von Ly-6G gebunden wurden, wurden diese sowohl von Alexa-Fluor 647 als auch von PerCP-Vio700 gefärbt. Dadurch wurde die Fluoreszenz auch von den beiden Detektoren FL 4 und FL3 erfasst und die Granulozyten-Population erschien im oberen rechten Quadranten der Flow-Jo-Grafik.

Anschließend wurde die Region der Monozyten (oberer linker Quadrant) gekennzeichnet und die Monozytenanzahl konnte abgelesen werden (Abb. 11).

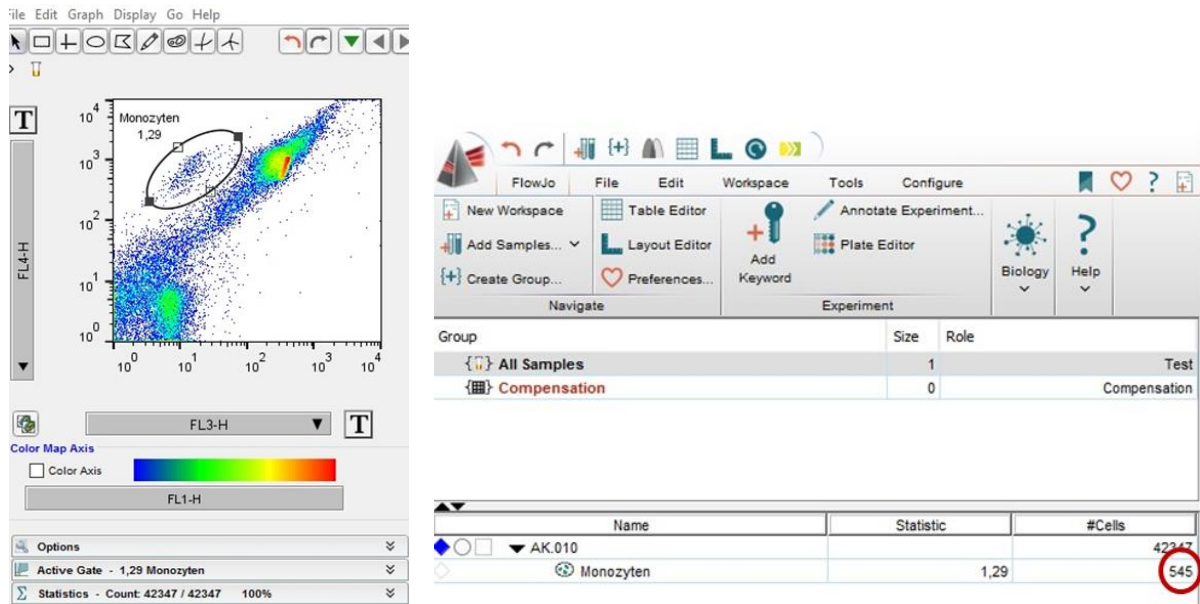


Abb. 11 Quantifizierung der Monozyten mittels FlowJo

Die Population der Monozyten erscheint im oberen linken Quadranten. Nach Kennzeichnung der Monozyten-Region konnte die Anzahl der Monozyten direkt abgelesen werden (rot markiert).

Für die Quantifizierung der Granulozyten wurde der gleiche Datensatz verwendet. In dem Detektionsfenster FL4 gegen FL3 kam es zu einer Überlagerung der Fluoreszenz der Granulozyten-bindenden Antikörper und der *Counting-Beads*. Deshalb wurde nach dem

Kennzeichnen der Granulozyten-Region (oberer rechter Quadrant) die Anzahl der gezählten *Beads* (10.000) von der angegebenen Anzahl der Granulozyten abgezogen, um die exakte Anzahl der Granulozyten zu erhalten (Abb. 12).

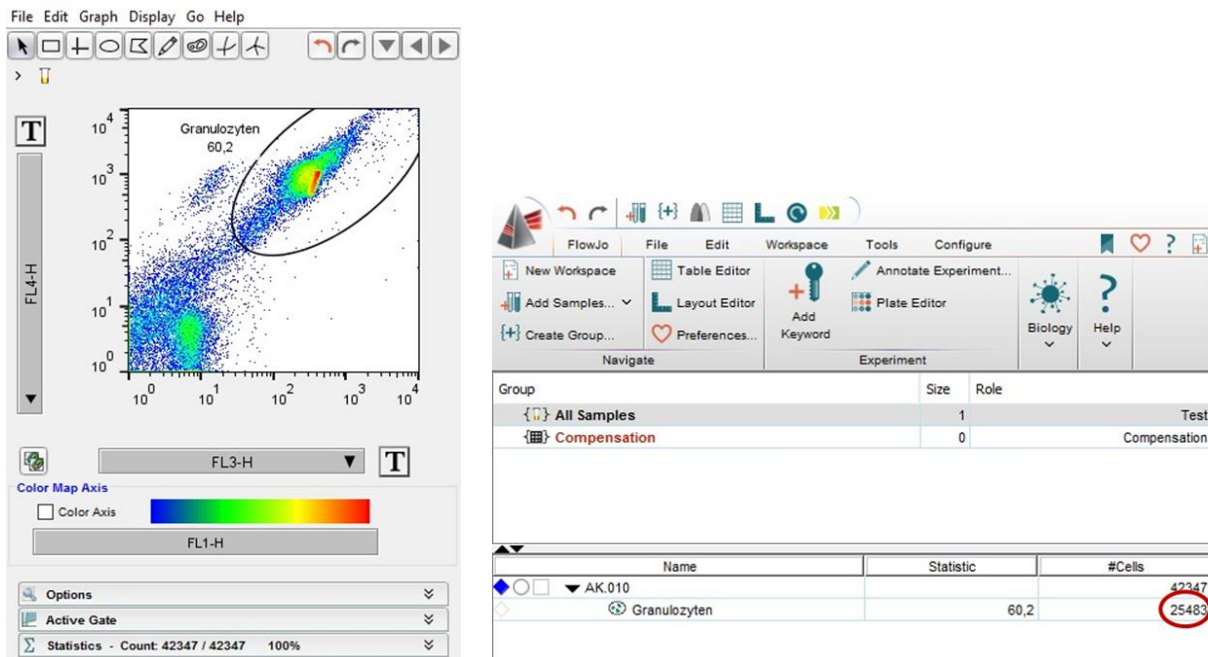


Abb. 12 Quantifizierung der Granulozyten mittels FlowJo

Die Population der Granulozyten erscheint im oberen rechten Quadranten. Nach Kennzeichnung der Granulozyten-Region musste die Anzahl der *Beads* (10.000) von der angezeigten Anzahl der Granulozyten (rot markiert) abgezogen werden.

3.4.3 Biodistribution von *firefly*-Luciferase (FLuc)-mRNA

In diesem Versuchsabschnitt wurde die Verteilung der *firefly*-Luciferase (FLuc) nach Applikation der entsprechenden mRNA in den Versuchstieren ermittelt. FLuc wurde als Viomer-Nukleinsäure-Komplex i.p. oder i.v. appliziert. Leber, Milz, Knochenmark und Blut wurden 6 bzw. 24 Stunden nach der Applikation entnommen (siehe 3.4.3.2) und die Konzentration der Luciferase in diesen Proben mittels Biolumineszenz-Analyse (siehe 3.4.3.7) bestimmt. Bei dieser Analyse wurde ein *Beetle Lysis Juice* zu der Luciferase-haltigen Probe hinzugegeben. Das in dem *Juice* enthaltene Luciferin diente der in der Probe enthaltenen Luciferase als Substrat, bei dessen Umsetzung eine messbare Biolumineszenz auftrat.

3.4.3.1 Versuchsaufbau

Die Versuche für die Biodistribution der FLuc-mRNA erfolgten in 3 Versuchsabschnitten. In den ersten beiden Versuchen wurden die Versuchstiere in 2 Gruppen eingeteilt (siehe Tab. 1). Im ersten Versuch erhielt die eine Gruppe eine i.p.-Applikation mit 150 µl PBS. Die andere Gruppe erhielt eine i.p.-Applikation mit 150 µl des Viomer-FLuc-mRNA-Komplexes (siehe 3.3). Im Zweiten Versuch erfolgten die Applikationen in jeder Gruppe äquivalent dazu i.v.

(Tierärztliche Vereinigung für Tierschutz 2010). Die eine Hälfte der Tiere jeder Gruppe wurde sechs Stunden nach der Applikation, die andere Hälfte 24 Stunden nach der Applikation mit Isofluran narkotisiert und Leber, Milz, Knochenmark und Blut wurden entnommen (siehe 3.4.3.2).

Tab. 1 Gruppeneinteilung für die Bestimmung der Biodistribution von FLuc-mRNA

Applikation	Stichprobengröße (n =)	Zeitpunkt Entnahme
PBS	4	6 Stunden nach Applikation
Viomer-FLuc-mRNA-Komplex	4	
PBS	4	24 Stunden nach Applikation
Viomer-FLuc-mRNA-Komplex	4	

Im dritten Versuchsabschnitt wurden die Versuchstiere erneut in 2 Gruppen eingeteilt. Beide Gruppen erhielten zu Beginn eine i.v.-Applikation, je nach Behandlungsgruppe (siehe Tab. 2) entweder mit 150 µl PBS oder Viomer-FLuc-mRNA-Komplex (siehe 3.3). 6 Stunden später erhielten alle Tiere eine i.p.-Applikation mit 2 g/kg KGW Thioglykolat. Dazu wurde ein entsprechendes Volumen einer 8 %igen Thioglykolat-Lösung injiziert. 4 Stunden nach der i.p.-Applikation wurden alle Tiere mit Isofluran narkotisiert und Leber, Milz, Knochenmark, Plasma entnommen und eine *Peritoneallavage* durchgeführt.

Tab. 2 Gruppeneinteilung für die Bestimmung der Biodistribution von FLuc-mRNA mit zusätzlich ausgelöster Inflammation

	1. Applikation i.v.	2. Applikation i.p.	Stichprobengröße (n =)
Kontrollgruppe	PBS	Thioglykolat	3
Behandlungsgruppe	Viomer-FLuc-mRNA-Komplex	Thioglykolat	3

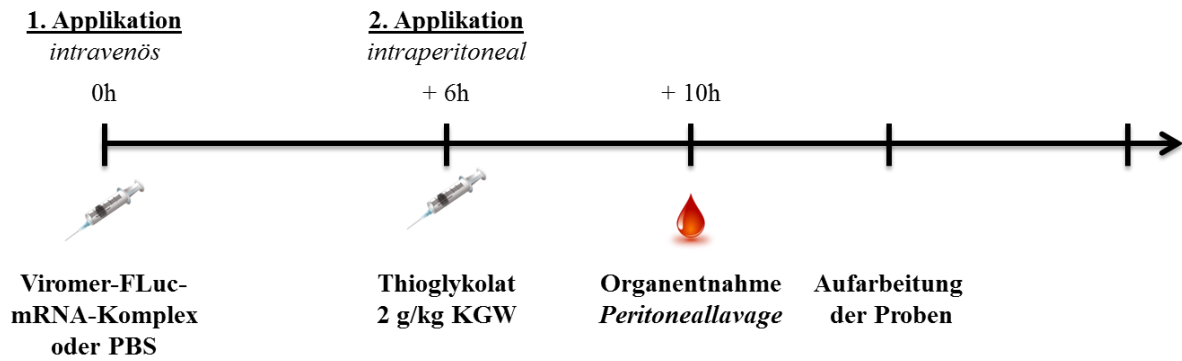


Abb. 13 Versuchsaufbau für die Ermittlung der Biodistribution im Inflammationsmodell

Der Viromer-Nukleinsäure-Komplex wurde i.v. appliziert. 6 Stunden später erfolgte eine i.p.-Applikation einer 8 %igen Thioglykolat-Lösung (2 g/kg KGW). Nach weiteren 4 Stunden wurden Leber, Milz, Knochenmark, Plasma entnommen und eine *Peritoneallavage* durchgeführt und die Konzentration der Luciferase mittels Biolumineszenz-Messung ermittelt.

3.4.3.2 Organentnahme

Die Organentnahme erfolgte wie unter 3.4.2.3 beschrieben. Milz und Leber wurden anschließend mit einer 21er Skalpellklinge in ca. 1 mm³ große Stücke zerkleinert, in ein mit 1 ml HBSS gefülltes 50 ml Falcon-Gefäß überführt und bis zur weiteren Aufarbeitung (siehe 3.4.3.3 - 3.4.3.6) auf Eis gelagert.

3.4.3.3 Isolierung von Splenozyten

In ein 50 ml Falcon-Gefäß mit den zerkleinerten Milzstücken (siehe 3.4.3.2) wurden 40 ml eines Verdauungspuffers (Zusammensetzung siehe Tab. 3) hinzugegeben und für 45 Minuten bei 37 °C inkubiert. Dieses Gemisch wurde nach der Inkubation zuerst durch einen 100 µm, nachfolgend durch einen 40 µm *Cell-Strainer* filtriert. Die Proben wurden danach bei 300 × g für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 10 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer (Zusammensetzung siehe Tab. 4) bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss an eine erneute Zentrifugation bei 300 × g für 10 Minuten bei 4 °C wurde das Zellpellet in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bis zur Biolumineszenz-Analyse (siehe 3.4.3.7) auf Eis gelagert.

Tab. 3 Zusammensetzung des Verdauungspuffers

Substanz	Konzentration
Collagenase IV	1 mg/L
DNase I	50 mg/L
FBS	1% (v/v)
PBS (Life Technologies GmbH)	

Tab. 4 Zusammensetzung des Erythrozyten-Lyse-Puffers

Substanz	Konzentration
Ammoniumchlorid	155 mM
Kaliumhydrogencarbonat	10 mM
EDTA	126 μ M
H ₂ O bidest.	

3.4.3.4 Isolierung von Hepatozyten

Die Isolierung der Hepatozyten erfolgte analog zur Splenozyten-Isolation (siehe Kapitel 3.4.3.3) aus den vorbehandelten Stücken der entnommenen Lebern (Manchekar et al. 2015).

3.4.3.5 Isolierung von Knochenmarkzellen

Das Knochenmark-HBSS-Gemisch (siehe 3.4.3.2) wurde in ein 15 ml Falcon-Gefäß überführt, auf 15 ml mit HBSS aufgefüllt und mittels Durchmischens mit einer Einkanalpipette homogenisiert. Nach einer Zentrifugation bei $200 \times g$ für 8 Minuten wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 10 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer (siehe Tab. 4) resuspendiert. Im Anschluss an eine zweiminütige Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Probe erneut bei $200 \times g$ für 8 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 1 ml HBSS resuspendiert. Die Suspension wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei $200 \times g$ für 8 Minuten zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde bis zur Biolumineszenz-Analyse (siehe 3.4.3.7) auf Eis gelagert.

3.4.3.6 Isolierung von Monozyten mittels Gradientenzentrifugation

Um die Monozyten von den restlichen Blutzellen aus der gewonnenen Blutprobe zu trennen, wurde eine Gradientenzentrifugation mit Hilfe einer Percoll-Lösung durchgeführt (Pertoft et al. 1980). Um die Percoll-Lösung auf eine Dichte von 1,078 g/ml einzustellen, wurden für einen 20 ml Ansatz 11,11 ml Percoll, 2 ml 1,5 M NaCl und 6,89 ml H₂O bidest. gemischt. Dadurch passierten Erythrozyten und Granulozyten die Percoll-Phase beim Zentrifugieren, Monozyten und Lymphozyten sammelten sich in der Interphase an. Das entnommene Blut von allen Tieren einer Versuchsgruppe wurde von den Heparin-Röhrchen in einem 15 ml Falcon-Gefäß vereinigt und mit PBS auf ein Gesamtvolumen von 7 ml aufgefüllt. Anschließend wurde das Blut-PBS-Gemisch sehr langsam auf 3 ml einer in einem 15 ml Falcon-Gefäß vorgelegten Percoll-Verdünnung gegeben und bei $900 \times g$ für 30 Minuten zentrifugiert, ohne dass der Rotor nach Ablauf der Zeit abgebremst wurde. Die entstandene Interphase (siehe Abb. 14) wurde in

ein neues 15 ml Falcon-Gefäß überführt und mit HBSS auf ein Gesamtvolumen von 10 ml aufgefüllt.

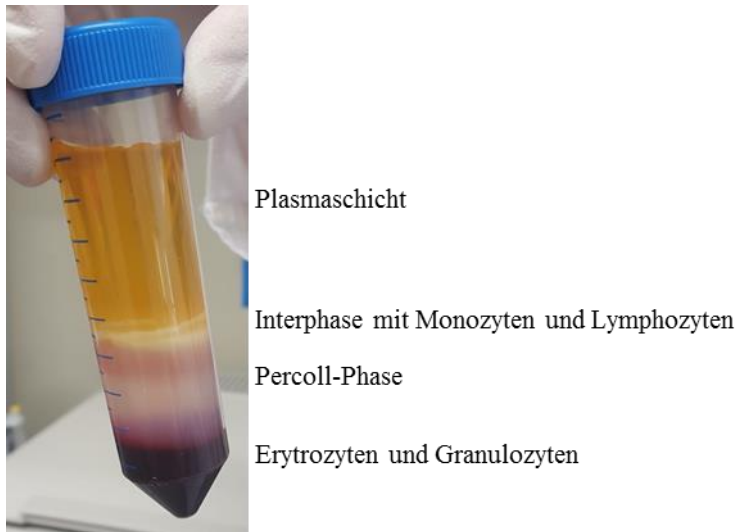


Abb. 14 Gradientenzentrifugation mittels Percoll-Verdünnung.

Darstellung der Interphase während eines Etablierungsversuchs mit humanem Blut.

Im Anschluss an die Zentrifugation bei $400 \times g$ für 10 Minuten wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in 10 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer (Tab. 4) resuspendiert und für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Wenn nach erneuter Zentrifugation bei $400 \times g$ für 5 Minuten das Zellpellet noch eine Rotfärbung aufwies, wurde der Lyse-Schritt wiederholt. Danach wurde das Zellpellet in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bis zur Biolumineszenz-Analyse (3.4.3.7) auf Eis gelagert.

3.4.3.7 Biolumineszenz-Analyse

Die Analyse der Biolumineszenz der Zellpellets aus den entnommenen Proben (siehe 3.4.3.3 - 3.4.3.6) wurde von Dr. Christian Reinsch (Lipocalyx GmbH) durchgeführt.

Die Zellpellets wurden wieder auf Raumtemperatur adaptiert und je nach Zellzahl wurden 10 - 25 μl der Probe mit 150 μl $1\times$ *Beetle Lysis Juice* lysiert. Die Proben wurden für 10 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 100 μl der Lösung in eine weiße 96-Well-Platte übertragen. Die Biolumineszenz jedes Wells wurde bei einer Sekunde Integrationszeit am Glomax *Plate-reader* gemessen.

3.4.3.8 7ND-mRNA Quantifizierung

Für die 7ND-mRNA Quantifizierung wurden nur Proben aus dem Versuchsabschnitt 3.4.6 (Testung der Effektivität des Viomer-7ND-mRNA-Komplex) verwendet (Versuchsaufbau siehe Abb. 15). Den Versuchstieren wurden, wie in Kapitel 3.4.2.3 beschrieben, Leber, Milz, Knochenmark, Plasma entnommen, eine *Peritoneallavage* durchgeführt und die entnommenen Proben aufbereitet. Die bei -80°C gelagerten Organe bzw. Zellpellets wurden für die Quantifizierung der mRNA-Mengen an das Fremdlabor Axolabs versandt.

Zur spezifischen Quantifizierung der mRNA wurde die *branched DNA* Technologie der Firma QuantiGene verwendet. Diese beruht auf der kooperativen Hybridisierung von Ziel-mRNA Molekülen und einem genspezifischen Probenet (einzelssträngige DNA-Sequenzen). Dieses Probenet besteht aus 6 *Capture Extender* DNA-Sequenzen (Hybridisierung des 5'-Endes mit Ziel-mRNA, des 3'-Endes mit einzelssträngigen *Capture*-DNA-Sequenzen [immobilisiert an Assayplatte]), 14 *Label Extender* DNA-Sequenzen (Hybridisierung des 5'-Endes mit der Ziel-mRNA, das 3'-Ende stellt die Grundlage zur Hybridisierung mit dem 2.0 *PreAmplifier* dar) und 4 *Blocking* Proben. Die Anzahl der *Label Extender* Sequenzen definiert die Sensitivität des Assays, weil die *Amplifier* mit gekoppelten *Labelprobes* (Lumineszenzsignal) über die Hybridisierung des *PreAmplifiers* im darauffolgenden Schritt hieran binden. Da das Lumineszenz-Signal dementsprechend proportional zur Menge an Ziel-mRNA ist, kann über die Lumineszenzmessung unter Berücksichtigung einer Referenz (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase = GAPDH), der mRNA-Gehalt bestimmt werden.

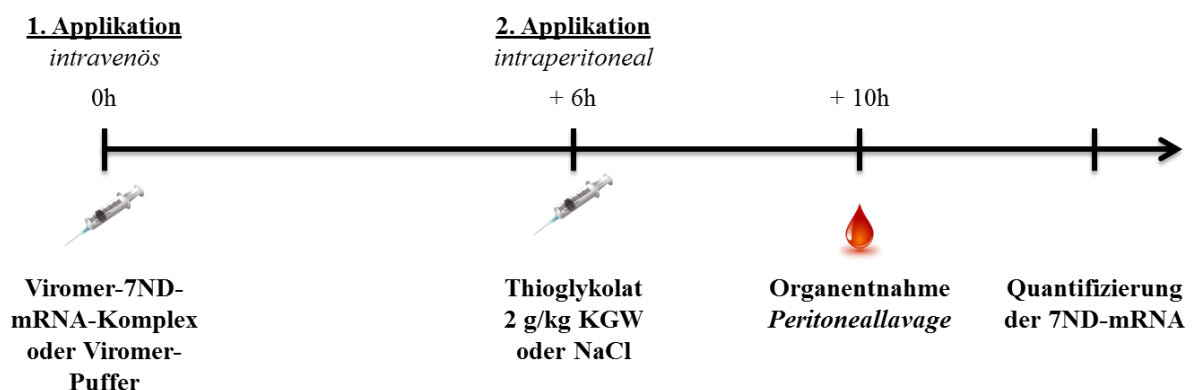


Abb. 15 Versuchsaufbau für die Quantifizierung der 7ND-mRNA

Der Viomer-Nukleinsäure-Komplex wurde i.v. appliziert. 6 Stunden später erfolgte eine i.p.-Applikation einer 8 %igen Thioglykolat-Lösung (2 g/kg KGW). Nach weiteren 4 Stunden wurden Leber, Milz, Knochenmark, Plasma entnommen, eine *Peritoneallavage* durchgeführt und in den Geweben/Zellen der 7ND-mRNA-Gehalt durch die Firma Axolabs quantifiziert.

3.4.3.9 Toxizitätstest: Analyse der Aktivitäten der Leberenzyme Aspartat-Aminotransferase (AST), Alanin-Aminotransferase (ALT) und des unspezifischen Toxizitätsmarkers Laktat-Dehydrogenase (LDH)

Für einen Toxizitätstest wurde den Versuchstieren aller Versuchsgruppen aus den Versuchen unter 3.4.4.2 und 3.4.5.1 während der finalen Herzpunktion 300 µl Blut entnommen und dieses in ein Lithium-Heparin-Röhrchen überführt. Das Röhrchen wurde für 10 Minuten bei $2000 \times g$ bei 4 °C zentrifugiert, ca. 90 µl Plasma abgenommen und in ein 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Probe wurde anschließend an das Medizinische Tierklinik-Labor der Fakultät für Veterinärmedizin der Universität Leipzig gesendet. Dort wurden die Aktivitäten der ALT, AST und LDH mit Hilfe von Laborautomaten für die Bestimmung klinisch-chemischer Parameter (COBAS c311, Roche) bestimmt.

3.4.4 **Effektivität des zu testenden Viomer-7ND-mRNA-Komplexes im Modell der Thioglykolat-induzierten Peritonitis**

3.4.4.1 Versuchsaufbau *intravenöse* Applikation

Für die Herstellung der 8 %igen Thioglykolat-Lösung siehe 3.4.2.1.

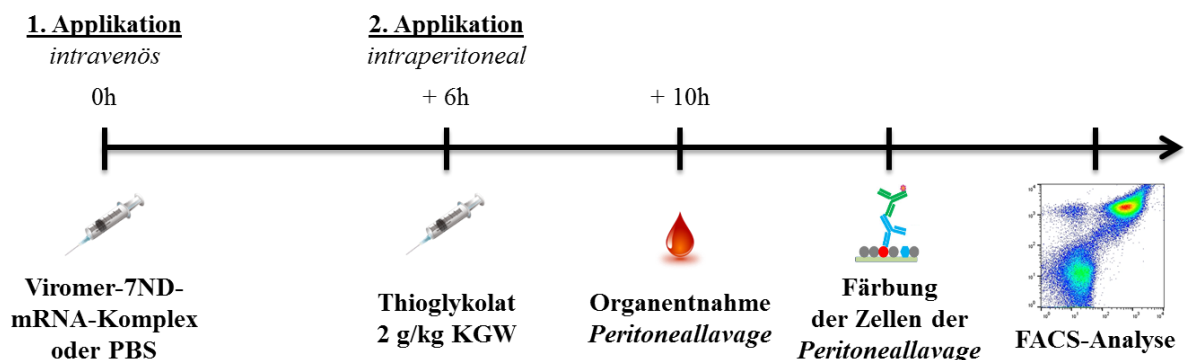


Abb. 16 Versuchsaufbau zur Testung des Viomer-7ND-mRNA-Komplexes

Der Viomer-7ND-mRNA-Komplex wurde i.v. appliziert. 6 Stunden später erfolgte eine i.p.-Applikation einer 8 %igen Thioglykolat-Lösung (2 g/kg KGW). Nach weiteren 4 Stunden wurde eine *Peritoneallavage* durchgeführt und die gewonnenen Zellen mittels FACS analysiert.

Im ersten Versuchsabschnitt wurden die Versuchstiere in 2 Gruppen à 3 Tiere eingeteilt. Als Kontrolle diente ein unbehandeltes Tier. In diesem Versuch wurde die erste Applikation i.v. durchgeführt, je nach Behandlungsgruppe (siehe Tab. 5) entweder 150 µl PBS oder Viomer-7ND-mRNA-Komplex (siehe 3.3). Die Applikation von 2 mg/kg KGW Thioglykolat (Injektion eines entsprechenden Volumens einer 8 %igen Thioglykolat-Lösung) bzw. volumenäquivalentem PBS erfolgte 6 Stunden später i.p. (Abb. 16). Weitere 4 Stunden später wurden alle Tiere mit Isofluran narkotisiert und eine *Peritoneallavage* durchgeführt. Die

zellulären Bestandteile der Lavage wurden anschließend mittels FACS analysiert (siehe 3.4.2.4), um die ins *Peritoneum* eingewanderten Monozyten zu quantifizieren.

Tab. 5 Gruppeneinteilung für die *intravenöse* Applikation des Viomer-7ND-mRNA-Komplexes

	1. Applikation i.v.	2. Applikation i.p.	Stichprobengröße (n =)
Kontrollgruppen	-	-	1
	PBS	Thioglykolat	1
Behandlungsgruppe	Viomere-7ND- mRNA-Komplex	Thioglykolat	1

Für die Kapitel „Organentnahme/ *Peritoneallavage*“, „Durchflusszytometrie“, „Verwendete Antikörper“, „Probenaufbereitung“, „Probenanalyse“, „Datenauswertung“ siehe 3.4.2.

3.4.4.2 Reproduzierbarkeit der *intravenösen* Applikation und Testung der FLuc-mRNA

Die Wiederholung der i.v.-Applikation des Viomer-7ND-mRNA-Komplexes erfolgte wie in 3.4.4.1 beschrieben, allerdings mit 4 Gruppen á 4 Tieren und einer abweichenden Gruppeneinteilung (Tab. 6). Statt PBS wurde in den Kontrollgruppen der zu Beginn verwendete Viomer-Puffer i.v. appliziert und in der 2. Applikation statt PBS eine 0,9 %ige NaCl-Lösung i.p. appliziert.

Tab. 6 Gruppeneinteilung für die Beurteilung der Reproduzierbarkeit der i.v.-Applikation des Viomer-7ND-mRNA-Komplexes

	1. Applikation i.v.	2. Applikation i.p.	Stichprobengröße (n =)
Kontrollgruppen	-	-	1
	Viomere-Puffer	NaCl	4
	Viomere-7ND- mRNA-Komplex	NaCl	4
	Viomere-Puffer	Thioglykolat	4
Behandlungsgruppe	Viomere-7ND- mRNA-Komplex	Thioglykolat	4

Für die Testung der FLuc-mRNA wurden die Versuchstiere in 3 Gruppen à 3 Tiere eingeteilt (Tab. 7). Die erste Applikation wurde i.v. appliziert (Abb. 17), je nach Behandlungsgruppe entweder 150 µl Viomer-Puffer oder Viomer-FLuc-mRNA-Komplex (siehe 3.3). 6 Stunden später erfolgte die i.p.-Applikation von 2 mg/kg KGW Thioglykolat (Injektion eines entsprechenden Volumens einer 8 %igen Thioglykolat-Lösung) bzw. volumenäquivalenter 0,9 %iger NaCl-Lösung. Weitere 4 Stunden später wurden alle Tiere mit Isofluran narkotisiert und eine *Peritoneallavage* durchgeführt. Die zellulären Bestandteile der Lavage wurden anschließend mittels FACS analysiert (siehe 3.4.2.4).

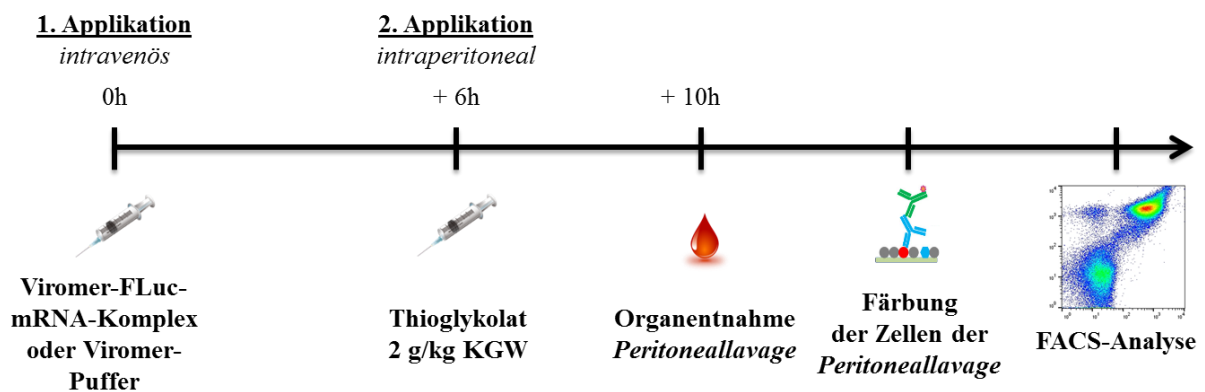


Abb. 17 Versuchsaufbau zur Testung des Viomer-FLuc-mRNA-Komplexes

Die Applikation des Viomer-FLuc-mRNA-Komplexes erfolgte *intravenös*. 6 Stunden später wurde eine 8 %ige Thioglykolat-Lösung (2 g/kg KGW) i.p. appliziert. Nach weiteren 4 Stunden wurde eine *Peritoneallavage* durchgeführt und die gewonnenen Zellen mittels FACS analysiert.

Tab. 7 Gruppeneinteilung für die *intravenöse* Applikation des Viomer-FLuc-mRNA-Komplexes

	1. Applikation i.v.	2. Applikation i.p.	Stichprobengröße (n =)
Kontrollgruppen	Viomer-Puffer	NaCl	3
	Viomer-Puffer	Thioglykolat	3
Behandlungsgruppe	Viomer-FLuc-mRNA-Komplex	Thioglykolat	3

Für die Kapitel „Organentnahme/ *Peritoneallavage*“, „Durchflusszytometrie“, „Verwendete Antikörper“, „Probenaufbereitung“, „Probenanalyse“, „Datenauswertung“ siehe 3.4.2.

3.4.4.3 Versuchsaufbau für die *intraperitoneale* Applikation

Die Versuchstiere wurden in 2 Gruppen à 3 Tiere eingeteilt. Als Kontrolle diente ein unbehandeltes Versuchstier. Alle anderen Tiere erhielten zu Beginn eine i.p.-Applikation, je nach Behandlungsgruppe (Tab. 8) entweder mit 150 µl PBS oder Viomer-7ND-mRNA-Komplex (siehe 3.3). 6 Stunden später erhielten alle Tiere eine i.p.-Applikation mit 2 g/kg KGW Thioglykolat. Dazu wurde ein entsprechendes Volumen einer 8 %igen Thioglykolat-Lösung injiziert. 4 Stunden nach der zweiten i.p.-Applikation wurden alle Tiere mit Isofluran narkotisiert und eine *Peritoneallavage* durchgeführt (Abb. 18). Anschließend wurden die Zellen in der Lavage mittels FACS analysiert (siehe 3.4.2.4).

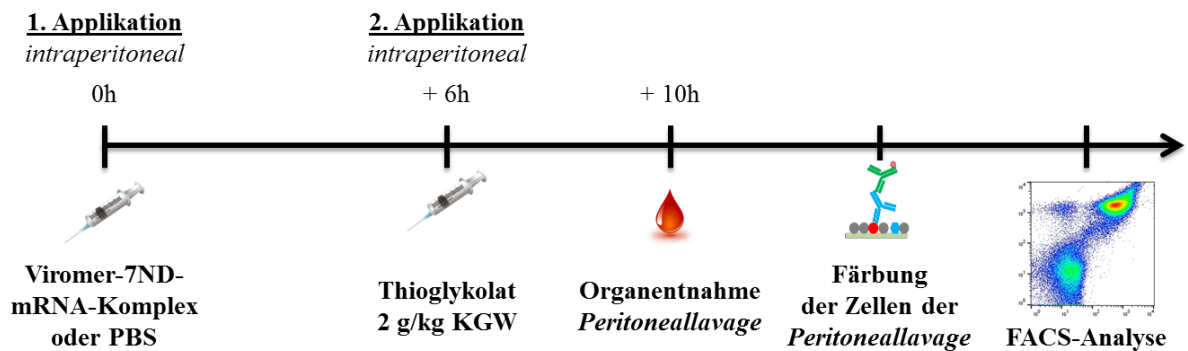


Abb. 18 Versuchsaufbau für die i.p. Applikation des Viomer-7ND-mRNA-Komplexes

Der Viomer-7ND-mRNA-Komplex wurde i.p. appliziert. 6 Stunden später erfolgte eine i.p.-Applikation einer 8 %igen Thioglykolat-Lösung (2 g/kg KGW). Nach weiteren 4 Stunden wurde eine *Peritoneallavage* durchgeführt und die gewonnenen Zellen mittels FACS analysiert.

Tab. 8 Gruppeneinteilung für die i.p. Applikation des Viomer-7ND-mRNA-Komplexes

	1. Applikation i.p.	2. Applikation i.p.	Stichprobengröße (n =)
Kontrollgruppen	-	-	1
	PBS	Thioglykolat	3
Behandlungsgruppen	Viomer- 7ND- mRNA-Komplex	Thioglykolat	3

3.4.5 Effektivität des zu testenden Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes im Modell der Thioglykolat-induzierten Peritonitis

3.4.5.1 Versuchsaufbau *intravenöse* Applikation

Für die Herstellung der 8 %igen Thioglykolat-Lösung siehe 3.4.2.1.

Im ersten Versuchsabschnitt wurden die Versuchstiere in 4 Gruppen à 4 Tiere eingeteilt. Als Kontrolle diente ein unbehandeltes Tier. In diesem Versuch wurde die erste Applikation i.v. appliziert, je nach Behandlungsgruppe (Tab. 9) entweder 150 µl Viomer-Puffer oder Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplex (siehe 3.3). Die Applikation von 2 g/kg KGW Thioglykolat (Injektion eines entsprechenden Volumens einer 8 %igen Thioglykolat-Lösung) bzw. volumenäquivalenter 0,9 %iger NaCl-Lösung erfolgte 6 Stunden später i.p. (Abb. 19). Weitere 4 Stunden später wurden alle Tiere mit Isofluran narkotisiert und eine *Peritoneallavage* durchgeführt. Die Lavagezellen wurden anschließend mittels FACS analysiert (siehe 3.4.2.4).

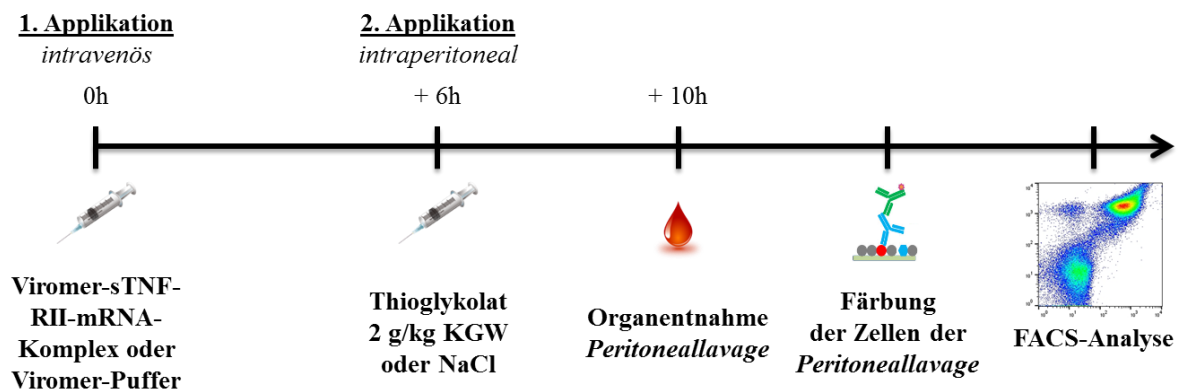


Abb. 19 Versuchsaufbau zur Testung des Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes

Die Applikation des Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes erfolgte i.v. 6 Stunden später wurde eine 8 %ige Thioglykolat-Lösung (2 g/kg KGW) i.p. appliziert. Nach weiteren 4 Stunden wurde eine *Peritoneallavage* durchgeführt und die gewonnenen Zellen mittels FACS analysiert.

Tab. 9 Gruppeneinteilung für die *intravenöse* Applikation des Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes

	1. Applikation i.v.	2. Applikation i.p.	Stichprobengröße (n =)
Kontrollgruppen	-	-	1
	Viomer-Puffer	NaCl	4
	Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplex	NaCl	4
	Viomer-Puffer	Thioglykolat	4
Behandlungsgruppe	Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplex	Thioglykolat	4

Für die Kapitel „Organentnahme/ *Peritoneallavage*“, „Durchflusszytometrie“, „Verwendete Antikörper“, „Probenaufbereitung“, „Probenanalyse“, „Datenauswertung“ siehe 3.4.2.

3.4.5.2 Reproduzierbarkeit der *intravenösen* Applikation und Testung der FLuc-mRNA

Die Wiederholung der i.v.-Applikation des Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes erfolgte analog zu Abschnitt 3.4.5.1, allerdings mit 3 Gruppen á 3 Tieren und einer abweichenden Gruppeneinteilung (Tab. 10)

Tab. 10 Gruppeneinteilung für die Beurteilung der Reproduzierbarkeit der i.v.-Applikation des Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes

	1. Applikation i.v.	2. Applikation i.p.	Stichprobengröße (n =)
Kontrollgruppen	Viomer-Puffer	NaCl	3
	Viomer-Puffer	Thioglykolat	3
Behandlungsgruppe	Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplex	Thioglykolat	3

Die Testung der FLuc-mRNA erfolgte wie unter 3.4.4.2 beschrieben.

3.4.5.3 Versuchsaufbau *intraperitoneale* Applikation

Die i.p.-Applikation des Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes erfolgte analog des in Abschnitt 3.4.4.3 beschriebenen Vorgehens.

3.4.6 Zusammenfassender Versuch zur *intravenösen* Applikation des Viomer-7ND-und des sTNF-RII-mRNA-Komplexes

In diesem Versuchsabschnitt wurden die Versuchstiere in 4 Gruppen (à 7-8) eingeteilt (Tab. 11). Die Applikation der Viomer-Nukleinsäure-Komplexe und die Durchführung der Lavagezell-Analyse erfolgte analog zu den Abschnitten 3.4.4.2 und 3.4.5.1.

Tab. 11 Einteilung der Gruppen für die i.v. Applikation des Viomer-7ND- und des sTNF-RII-mRNA-Komplexes

	1. Applikation i.v.	2. Applikation i.p.	Stichprobengröße (n =)
Kontrollgruppen	Viomer-Puffer	Thioglykolat	7
	Viomer-FLuc-mRNA-Komplex	Thioglykolat	7
Behandlungsgruppen	Viomer-7ND-mRNA-Komplex	Thioglykolat	8
	Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplex	Thioglykolat	8

Für die Kapitel „Organentnahme/ Lavage“, „Durchflusszytometrie“, „Verwendete Antikörper“, „Probenaufbereitung“, „Probenanalyse“, „Datenauswertung“ siehe 3.4.2.

3.5 Multiplexanalyse mittels Bio-Plex Pro™ Assay

Die Bio-Plex Pro™ Assays ermöglichen die Quantifizierung von bis zu 100 verschiedenen biologischen *Targets* innerhalb eines einzigen *Wells* einer 96-Well-Platte mit einem Probenvolumen von insgesamt ca. 20 µl Plasma oder 50 µl Zellkultur-Überstand. Das Prinzip dieser Analyse gleicht dem Aufbau eines *Sandwich-ELISA*, mit der Ausnahme, dass die gewünschten *Targets* mit Hilfe von kleinen magnetischen *Beads* gebunden werden können. Jeder *Bead* ist Zytokin-spezifisch mit einem individuellen Farbcode aus Rot und Infrarot markiert. Der Vorteil dieser magnetischen Separierung ist die höhere Reproduzierbarkeit im Vergleich zu einer Vakuumfiltration (BioRad 2019). An diese *Beads* sind Antikörper gekoppelt, die wiederum an den gewünschten Biomarker binden (Abb. 20). Durch mehrere Waschschrte werden die ungebundenen Proteine abgespült. In weiteren Schritten werden Detektions-Antikörper und fluoreszierende Indikatoren an den jeweiligen Biomarker gebunden. Innerhalb des Bio-Plex Gerätes befinden sich 2 Laser. Ein Laser im roten Farbspektrum detektiert die individuelle Farbcodierung auf den einzelnen *Beads* und klassifiziert sie je nach Zytokingruppe. Ein Laser im grünen Farbspektrum bestimmt die Anzahl der fluoreszierenden Indikatoren. Die Bio-Plex Software ermittelt anhand dieser Messwerte die mittlere Fluoreszenzintensität und die daraus resultierende Konzentration (in pg/ml) der einzelnen Zytokine. Die Durchführung der Assays erfolgte gemäß den Herstellerangaben.

3.5.1 Probenaufbereitung

Zu Beginn wurden alle gewünschten Zytokin-*Beads* vereinigt und jeweils 100 µl der Suspension pro *Well* auf eine 96-*Well* Platte gegeben. Nach zweimaligem Waschen wurden die Proben (Plasma 1:4 und Lavageflüssigkeit 1:2 in *Sample Diluent* verdünnt), Standards und Leerproben in die entsprechenden *Wells* übertragen. Weitere Schritte der Durchführung erfolgten laut den Herstellerangaben.

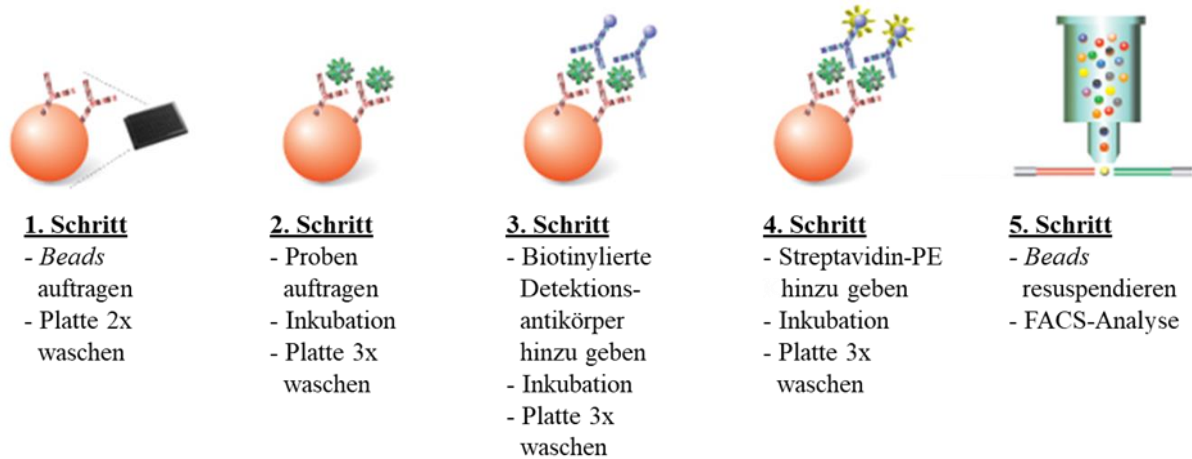


Abb. 20 Schematische Darstellung des Arbeitsablaufes eines Bio-Plex-Assays
modifiziert nach Geng et al. 2012

3.5.2 Verwendete Zytokine

Für die Multiplex-Analyse der Plasma- und *Peritoneallavageproben* (siehe 3.4.3-3.4.6) wurde ein individuell erstelltes 9-Plex-verwendet. Damit konnten folgenden Zytokine detektiert werden: IL-1 β , IL-6; IL-10; MIP-1 α , MIP-1 β , IFN- γ , RANTES, CCL2 und TNF- α (Tab. 12 und Tab. 13)

Tab. 12 Standardkonzentrationen der verwendeten Zytokine I

Höchste Standardkonzentrationen der verwendeten Zytokine für die Multiplex-Analyse der gewonnenen Plasma- und *Peritoneallavageproben* aus Versuchsabschnitt 3.4.2 - 3.4.5

Zytokin	Höchste Standardkonzentration [pg/ml]
IL 1 β	34 549
IL-6	11 625
IL-10	63 027
MIP-1 α	7 238
MIP-1 β	54 067
IFN- γ	13 587
RANTES	32 343
CCL2	184 597
TNF- α	72 868

Tab. 13 Standardkonzentrationen der verwendeten Zytokine II

Höchste Standardkonzentrationen der verwendeten Zytokine für die Multiplex-Analyse der gewonnenen Plasma- und Peritoneallavageproben aus Versuchsabschnitt 3.4.6

Zytokin	Höchste Standardkonzentration [pg/ml]
IL 1β	10 011
IL-6	11 162
IL-10	75 771
MIP-1α	10 404
MIP-1β	50 671
IFN-γ	15 449
RANTES	74 723
CCL2	186 185
TNF-α	71 880

3.5.3 Statistische Analyse

Die statistische Analyse erfolgte mit dem Programm GraphPad PRISM 5.0 für Windows. Die Daten wurden mittels *Box Plot* und Median mit Hilfe der Programmiersprache R dargestellt. Aufgrund der geringen Stichprobengrößen konnten keine Tests auf Normalverteilung erfolgen, weshalb für die statistischen Analysen Nichtparametrische-Tests verwendet wurden. Als statistische Tests wurden je nach Fragestellung Mann-Whitney-Test, Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's *multiple comparison post-hoc*-Test oder der paarweise Wilcoxon, Benjamini & Hochberg post-Test angewendet. Dabei wurden jeweils die Kontrollgruppen mit den Behandlungsgruppen verglichen. Für die statistische Analyse wurde das Signifikanzniveau $p < 0,05$ angewendet. Auf Grund der geringen Stichprobengröße sollten die Ergebnisse dieser Analysen jedoch kritisch betrachtet werden.

4 Ergebnisse

Thema dieser Arbeit waren Machbarkeitsstudien bezüglich der Eignung von Viromeren als neuartige Trägermaterialien für die Gentherapie primär entzündlicher Erkrankungen. Dazu wurde die Beeinflussung der Wirkung der inflammatorischen Mediatoren CCL2 und TNF- α näher untersucht. Die Effizienz der Viomer-vermittelten Transfektion von Zellen wurde zunächst im Zellkulturmaßstab analysiert.

4.1 Transfektionsversuch in RAW 246.7-Zellen

4.1.1 7ND-Konzentration der Zellüberstände nach Transfektion mit einem Viomer-7ND-mRNA-Komplex

RAW-Zellen wurden mit einem Viomer-7ND-mRNA-Komplex transifiziert und für 6, 24 und 30 Stunden inkubiert (siehe 3.4.1.1). Danach wurde die 7ND-Konzentration in den Zellüberständen mittels ELISA analysiert (siehe 3.4.1.2). Da das 7ND bis auf die Aminosäurereste 2-8 identisch zum CCL2 ist, konnte ein kommerziell erhältlicher CCL2-ELISA verwendet werden. Die Ergebnisse sind in Abb. 21 dargestellt.

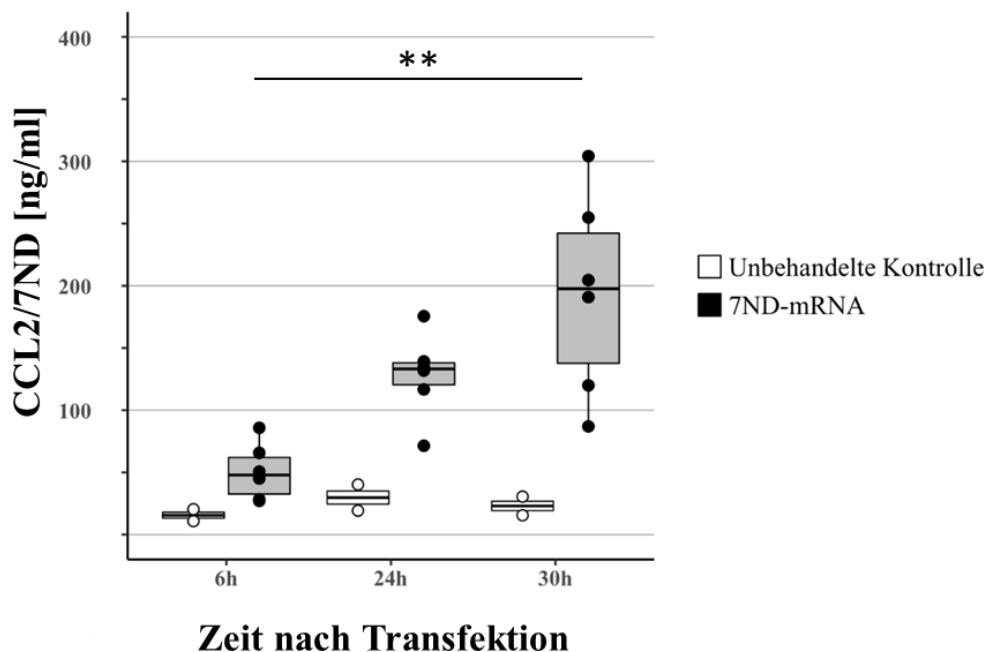


Abb. 21 CCL2/7ND-Konzentration in Zellkulturüberständen transfizierter RAW-Zellen

RAW-Zellen wurden mit einem Viomer-7ND-mRNA-Komplex transifiziert und die CCL2/7ND-Konzentration der Überstände nach 6, 24 und 30 Stunden mittels ELISA gemessen. Es gab einen Anstieg der CCL2/7ND-Konzentration nach 6, 24 und 30 Stunden gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Die Konzentration stieg in Abhängigkeit der Zeit über 6, 24 und 30 Stunden im Vergleich zu den Kontrollen weiter an. Die CCL2/7ND-Konzentration stieg nach der Transfektion in der Zeit von 6h auf 30h signifikant an (** p = 0,0027). Mann-Whitney-Test; n = 2-6.

Die CCL2/7ND-Expression ist gegenüber den unbehandelten Kontrollen an allen gemessenen Zeitpunkten erhöht. Es konnte festgestellt werden, dass mit steigender Inkubationsdauer auch die Konzentration an detektierbarem CCL2/7ND im Zellkulturüberstand signifikant (** $p = 0,0027$) zunimmt, was auf eine konstante CCL2/7ND-Expression in Abhängigkeit von der Zeit und eine Akkumulation des Proteins im Medium hinweist. Die CCL2/7ND-Konzentration in den unbehandelten Kontrollen blieb hingegen unverändert.

4.1.2 sTNF-RII-Konzentration in Zellkulturüberständen von RAW-Zellen nach Transfektion mit einem Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplex

RAW-Zellen wurden mit einem Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplex transfiziert und für 6, 24 und 30 Stunden inkubiert (siehe 3.4.1.1). Danach wurde die sTNF-RII-Konzentration in den Zellüberständen mittels ELISA analysiert (siehe 3.4.1.2).

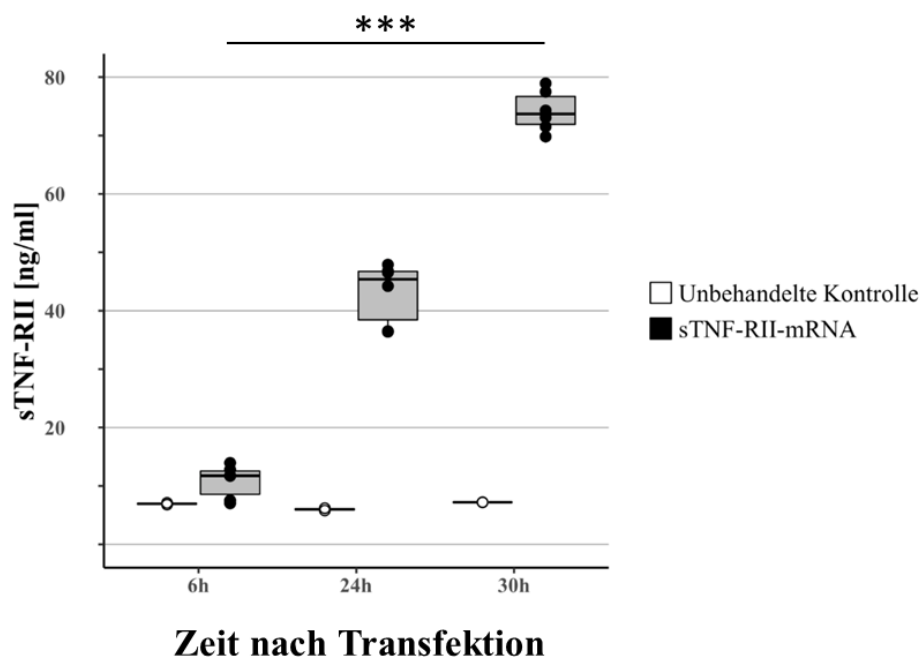


Abb. 22 sTNF-RII-Konzentration in Zellkulturüberständen transfizierter RAW-Zellen

RAW-Zellen wurden mit einem Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplex transfiziert. Die sTNF-RII-Konzentration der Überstände wurde nach 6, 24 und 30 Stunden mittels ELISA gemessen. Die sTNF-RII-Konzentration war nach 6, 24 und 30 Stunden gegenüber den unbehandelten Kontrollen erhöht. Die sTNF-RII-Konzentration stieg nach der Transfektion in der Zeit von 6h auf 30h signifikant an (** $p = 0,0005$). Mann-Whitney-Test; $n = 2-6$.

Die in Abb. 22 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die sTNF-RII-Konzentration gegenüber den unbehandelten Kontrollen nach 6, 24 und 30 Stunden erhöht war. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass die sTNF-RII-Konzentration in Abhängigkeit von der Zeit signifikant (** $p = 0,0005$) anstieg, wohingegen die Konzentrationen in den unbehandelten Kontrollen unverändert blieb. Ebenso wie für die Versuche zu 7ND, weisen auch diese Ergebnisse auf eine konstant erhöhte Expression der verwendeten mRNA hin.

4.2 Etablierung des Modells der Thioglykolat-induzierten Peritonitis

In der Zellkultur konnte die Eignung der gewählten Viromer-mRNA-Kombinationen bestätigt werden. Um eine potentiell therapeutische mRNA mit Hilfe eines Viromers in einem Organismus testen zu können, wurde im nächsten Schritt ein geeignetes Tiermodell etabliert, welches in der Lage ist, den therapeutischen Effekt durch einen einfachen Messwert (Monozyteninfiltration) anzuzeigen. Dazu wurde das Modell der Thioglykolat-induzierten Peritonitis gewählt. In den folgenden Kapiteln sind die Ergebnisse zur Charakterisierung dieses Modells dargestellt.

4.2.1 Bestimmung der Immunzellinfiltration ins *Peritoneum* nach Induktion der Thioglykolat-induzierten Peritonitis

Ziel der Etablierung war es, die Versuchsabläufe zu trainieren und die Färbung der gewonnenen *Peritoneallavage* für die Durchflusszytometrie aufzusetzen, um die infiltrierenden Immunzellen reproduzierbar qualitativ und quantitativ charakterisieren zu können.

Die Versuchstiere erhielten 2 g/kg KGW einer 8 %igen Thioglykolat-Lösung, um eine Peritonitis zu induzieren. Nach 4 h wurde eine *Peritoneallavage* durchgeführt und anschließend die gewonnenen Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert (siehe 3.4.2), die Ergebnisse sind in Abb. 23 dargestellt.

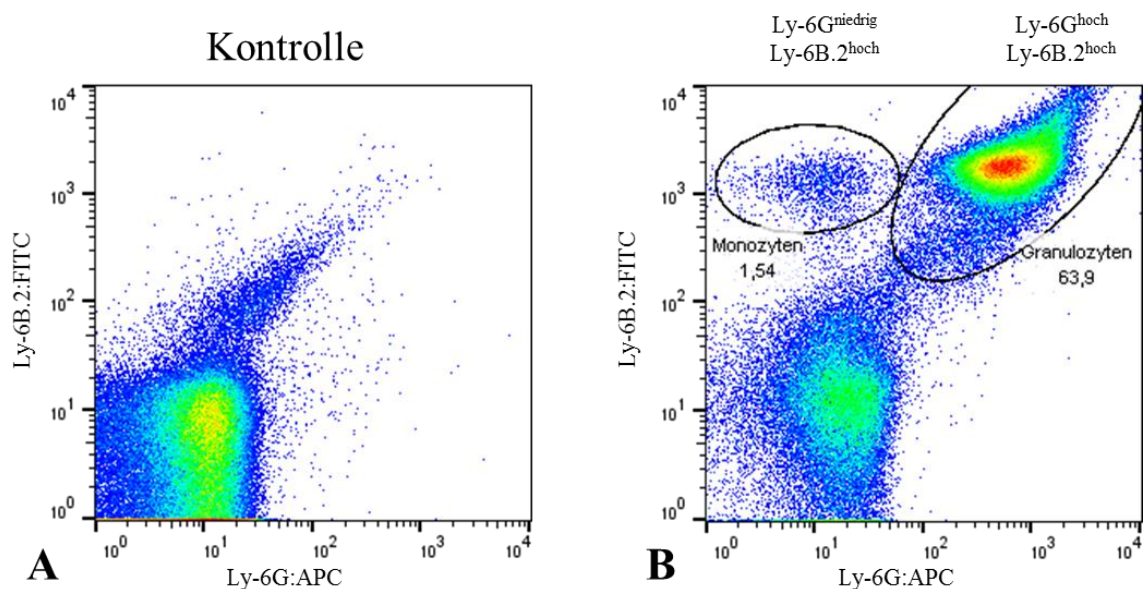


Abb. 23 Charakterisierung der infiltrierenden Immunzellen mittels Durchflusszytometrie

Zur Identifikation der Granulozyten wurde Ly-6G:APC und zur Identifikation der Monozyten und Granulozyten Ly6B.2-FITC verwendet. A: Der Kontrollgruppe wurde PBS i.p. appliziert. Es sind nur vereinzelte infiltrierende Zellen darstellbar. B: Der zweiten Gruppe wurde eine 8 %ige Thioglykolat-Lösung i.p. appliziert. Eine Anfärbung der infiltrierenden Monozyten und Granulozyten durch die verwendeten Antikörper ist sichtbar. n = 1

Ergebnisse

Der verwendete Antikörper Ly-6G:APC bindet an ein Monozyten-spezifisches Epitop und führt daher zur Färbung dieser Population im FACS durch das konjugierte Fluochrom APC. Der Antikörper Ly-6B.2:FITC erkennt dagegen ein Epitop sowohl auf Monozyten als auch auf neutrophilen Granulozyten (siehe 3.4.2).

In den Proben der Gruppe, bei der durch Applikation einer 8 %igen Thioglykolat-Lösung eine Peritonitis ausgelöst wurde, konnten sowohl infiltrierende Monozyten als auch Granulozyten eindeutig dargestellt werden (Abb. 23, rechts). In der Kontrollgruppe (Applikation von PBS) waren nur vereinzelte Zellen ins *Peritoneum* eingewandert (siehe Abb. 23, links). Die Isotyp-Kontrollen waren negativ (Abbildung nicht gezeigt).

Der Überstand der *Peritoneallavage* und das Plasma wurden zusätzlich mittels Bio-Plex analysiert (siehe 3.5). Eine repräsentative Auswahl der Ergebnisse der am stärksten veränderten Zytokine ist in Abb. 24 dargestellt.

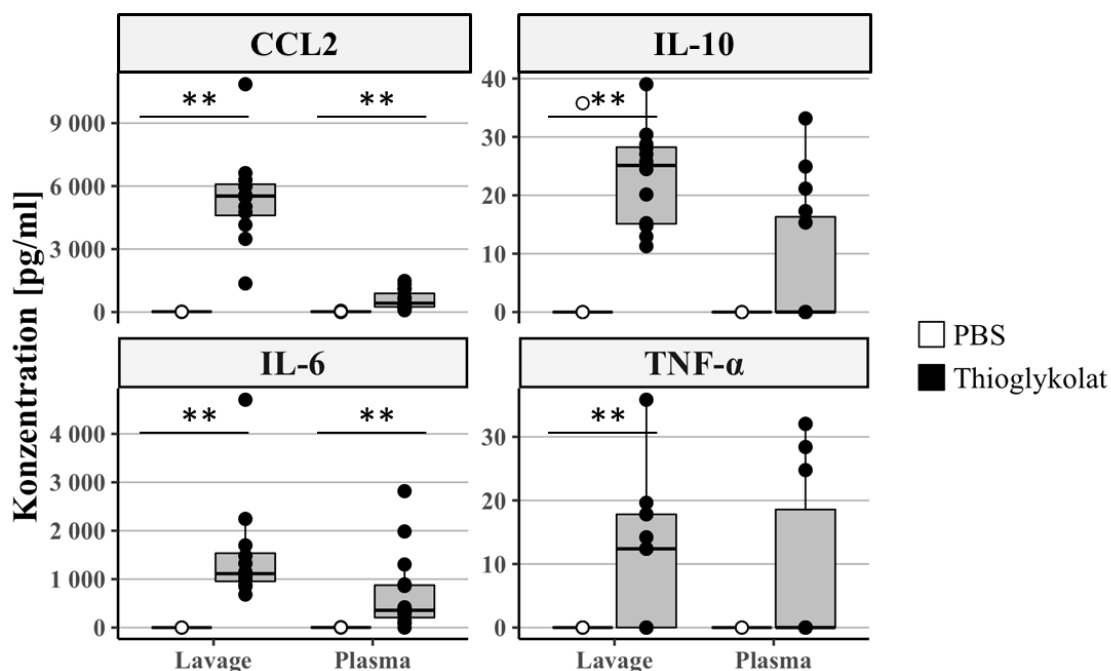


Abb. 24 Bio-Plex-Analyse des Überstandes der *Peritoneallavage* und von Plasmaproben während der Modelletablierung

Es wurde die Konzentration von 4 Zytokinen in Plasma- und *Peritoneallavageproben* mittels Bio-Plex-Analyse bestimmt. CCL2: erhöhte CCL2-Konzentration in der Lavage der Thioglykolat-Gruppe (** $p = 0,0043$); erhöhte CCL2-Konzentration im Plasma der Thioglykolat-Gruppe (** $p = 0,0032$). IL-10: erhöhte IL-10-Konzentration in der Lavage der Thioglykolat-Gruppe (** $p = 0,00498$). IL-6: erhöhte IL-6-Konzentration in der Lavage (** $p = 0,0041$) und im Plasma der Thioglykolat-Gruppe (** $p = 0,0079$). TNF-α: erhöhte TNF-α-Konzentration in der Lavage der Thioglykolat-Gruppe (* $p = 0,0445$). Mann-Whitney-Test; PBS: $n = 7$; Thioglykolat: $n = 12-15$.

Wie in Abb. 24 zu erkennen, kam es im Überstand der *Peritoneallavageproben* der Thioglykolat-behandelten Tiere zu einem Anstieg von CCL2, IL-10, IL-6 und TNF- α im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Im Plasma kam es zu einem Anstieg von CCL2 und IL-6 in der Thioglykolat-Gruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Abb. 24), wohingegen die Messwerte für IL-10 und TNF- α auf vergleichbare Konzentrationen zwischen Kontrollgruppe und Thioglykolat-behandelten Tieren hinweisen. Die Ergebnisse der am stärksten veränderten Zytokine wurden mittels Mann-Whitney-Test statistisch analysiert. Die sich daraus ergebenden Signifikanzen sind in Abb. 24 dargestellt. Für die Ergebnisse der weniger stark regulierten Zytokine sei auf die Tab. 46 und Tab. 47 im Anhang verwiesen.

4.3 Biodistribution

Nachdem die Machbarkeit der Transfektion mit Hilfe von Viomer-7ND bzw. Viomer-sTNF-RII in der Zellkultur bestätigt und das benötigte Tiermodell zur Untersuchung *in vivo* etabliert und charakterisiert werden konnte, wurde die Organspezifität der Viomerkomplexe bestimmt. Es sollte überprüft werden, welche Organe präferentiell von applizierten Viomer-Nukleinsäure-Komplexen in Abhängigkeit von zwei unterschiedlichen Applikationsrouten (i.v./ i.p.) transfiziert werden. Um zunächst eine Grundaussage über die Verteilung im Körper treffen zu können, wurde unbehandelten Mäusen eine Kontroll-mRNA, die für *Luciferase* kodiert, appliziert. Im Anschluss daran wurde diese mRNA auch im etablierten Modell der Thioglykolat-induzierten Peritonitis appliziert. Abschließend wurde die Verteilung einer zielspezifischen mRNA (7ND) direkt analysiert.

4.3.1 Biolumineszenz-Analyse nach *intravenöser* Applikation eines Viomer-*firefly*-Luciferase-mRNA-Komplexes

Um die Biodistribution einer exprimierten *firefly*-Luciferase (FLuc), kodiert durch eine spezifische mRNA, zu ermitteln, wurde den Versuchsgruppen ein Viomer-FLuc-mRNA-Komplex appliziert (siehe 3.4.3).

Zunächst erfolgte die Applikation des Komplexes *intravenös*. Nach 6 und 24 Stunden wurden den Versuchstieren Milz, Leber, Knochenmark und Blut entnommen. Die Biolumineszenz (*Relative Light Units* = RLU) der Proben wurde mittels Glomax *Plate-reader* gemessen. Die Ergebnisse sind in Abb. 25 dargestellt.

Ergebnisse

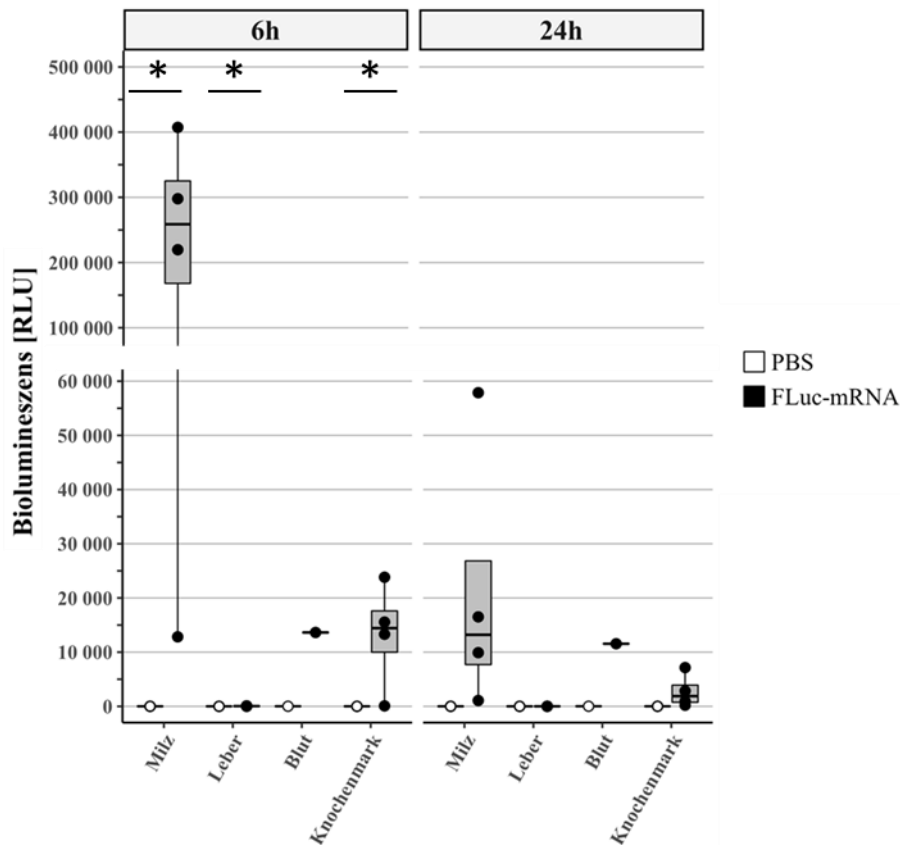


Abb. 25 Biolumineszenz-Analyse: i.v. Applikation des Viromer-FLuc-mRNA-Komplexes

Nach i.v.-Applikation des Viromer-FLuc-mRNA-Komplexes beziehungsweise einer Kontrolle (PBS) wurde die Biolumineszenz in Proben folgender Organe gemessen: Milz, Leber, Blut und Knochenmark. 6 Stunden nach der Applikation: erhöhte Luciferase-Biolumineszenz in Proben der Milz (* $p = 0,0294$), der Leber (* $p = 0,0286$), dem Blut und dem Knochenmark (* $p = 0,0294$) der Behandlungsgruppe. 24 Stunden nach der Applikation konnte in den Milzproben eine reduzierte Biolumineszenz im Vergleich zu 6 Stunden gemessen werden. Mann-Whitney-Test; $n = 4$

Nach 6 Stunden wurde eine erhöhte Luciferase-Biolumineszenz in den Milz-, Knochenmark- und Blutproben der Behandlungsgruppe gemessen, wohingegen keine Biolumineszenz in Proben der Leber detektierbar war. Die Erhöhung in der Milz war dabei am ausgeprägtesten. Nach 24 Stunden konnte in den Milzproben der Behandlungsgruppe nur noch eine reduzierte Biolumineszenz im Vergleich zur Biolumineszenz nach 6 Stunden gemessen werden (siehe Abb. 25). Die Ergebnisse der Biodistribution wurden mittels Mann-Whitney-Test statistisch analysiert. Die sich daraus ergebenden Signifikanzen sind in Abb. 25 dargestellt.

4.3.2 Biolumineszenz nach *intraperitonealer* Applikation eines Viromer-*firefly-Luciferase*-mRNA-Komplexes

Im vergleichenden Versuchsabschnitt wurde den Versuchsgruppen der Viromer-FLuc-mRNA-Komplex i.p. appliziert. Die Ergebnisse sind in Abb. 26 dargestellt.

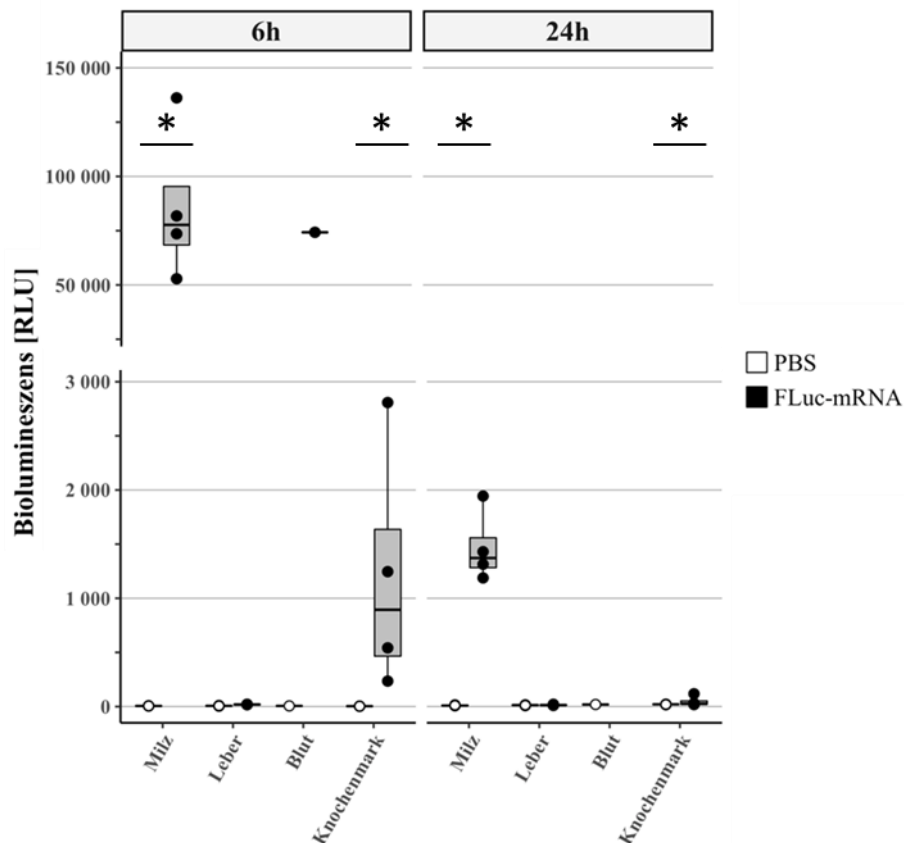


Abb. 26 Biolumineszenz-Analyse: i.p. Applikation des Viromer-FLuc-mRNA-Komplexes

Nach der i.p.-Applikation des Viromer-FLuc-mRNA-Komplexes beziehungsweise einer Kontrolle (PBS) wurde die Biolumineszenz in Proben folgender Organe gemessen: Milz, Leber, Blut; Knochenmark.

6 Stunden nach der Applikation: erhöhte Luciferase-Biolumineszenz in Proben der Milz (* $p = 0,0286$), im Blut und im Knochenmark (* $p = 0,0286$) der Behandlungsgruppe. 24 Stunden nach der Applikation: erhöhte Biolumineszenz in den Proben der Milz (* $p = 0,0294$) und im Knochenmark (* $p = 0,0286$) der Behandlungsgruppe. Mann-Whitney-Test; $n = 4$.

Nach 6 Stunden wurde eine erhöhte Luciferase-Biolumineszenz in Proben der Milz, im Blut und im Knochenmark der Behandlungsgruppe gemessen. In den Milzproben konnte dabei jedoch deutlich die stärkste Biolumineszenz detektiert werden. Nach 24 Stunden war die Biolumineszenz in den Proben der Behandlungsgruppe deutlich reduziert (Abb. 26). Die Ergebnisse der Biodistribution wurden mittels Mann-Whitney-Test statistisch analysiert. Die sich daraus ergebenden Signifikanzen sind in Abb. 26 dargestellt.

4.3.3 Biolumineszenz im Modell der Thioglykolat-induzierten Peritonitis

Nach der Charakterisierung der Verteilung in unbehandelten Mäusen erfolgte die Analyse der Biodistribution im etablierten Mausmodell der Thioglykolat-induzierten Peritonitis.

In diesem Versuchsabschnitt wurde den Versuchsgruppen der Viromer-FLuc-mRNA-Komplex i.v. appliziert und 6 Stunden später durch die i.p.-Applikation einer 8 %igen Thioglykolat-Lösung eine Peritonitis induziert (siehe 3.4.4). Weitere 4 Stunden später wurden den Versuchstieren Milz, Knochenmark und Leber entnommen sowie eine *Peritoneallavage* durchgeführt und die Biolumineszenz (*Relative Light Units* = RLU) in den jeweiligen Proben analysiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 27 dargestellt.

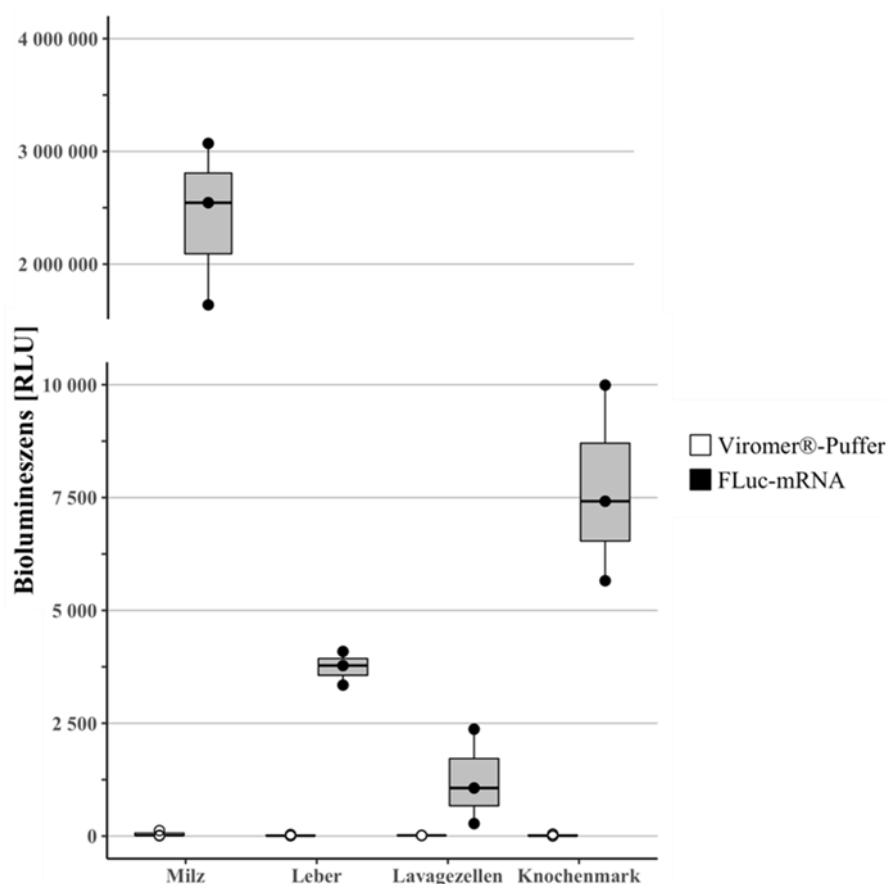


Abb. 27 Biolumineszenz-Analyse im Modell der Thioglykolat-induzierten Peritonitis

6 Stunden nach der i.p.-Applikation des Viromer-FLuc-mRNA-Komplexes beziehungsweise einer Kontrolle (Viromer-Puffer) wurde durch die Applikation einer 8%igen Thioglykolat-Lösung eine Peritonitis induziert. Nach 4 Stunden wurde die Biolumineszenz der folgenden Organe gemessen: Milz, Leber, Lavagezellen, Knochenmark. Es wurde eine erhöhte Luciferase-Biolumineszenz in allen entnommenen Organproben der FLuc-mRNA-Gruppe gemessen. Mann-Whitney-Test; n = 3.

Es konnte eine deutlich erhöhte Luciferase-Expression in den Proben aller analysierten Organe der Behandlungsgruppe gegenüber den Organproben der Kontrollgruppe gemessen werden (Abb. 27). Auch in diesem Versuchsaufbau konnte die stärkste Biolumineszenz in den Milzproben detektiert werden. Auf Grund der geringen Stichprobengröße sollten die nicht signifikanten Ergebnisse des Mann-Whitney-Tests kritisch betrachtet werden.

4.3.4 Quantifizierung der 7ND-mRNA nach *intravenöser* Applikation

Nachdem mittels FLuc die Organspezifität der Viromerkomplexe initial ermittelt worden ist, sollte im nächsten Versuch die Verteilung der applizierten 7ND-mRNA direkt nachgewiesen werden. Dies war möglich, da sich diese mRNA durch die Deletion am N-Terminus von nativem CCL2 unterscheidet. Um die Biodistribution der 7ND-mRNA im Inflammations-Modell zu ermitteln, wurde den Versuchsgruppen ein Viromer-7ND-mRNA-Komplex i.v. appliziert. Nach 6 Stunden wurde durch die i.p.-Applikation einer 8 %ige Thioglykolat-Lösung eine Peritonitis induziert. 4 Stunden später wurden den Versuchstieren Milz, Leber, Knochenmark entnommen und eine *Peritoneallavage* durchgeführt (siehe 3.4.4). Anschließend wurden die Proben durch die Firma Axolabs aufgearbeitet und die Konzentration der 7ND-mRNA bestimmt (siehe 3.4.3.8). Die Ergebnisse sind in der Abb. 28 und Abb. 29 dargestellt.

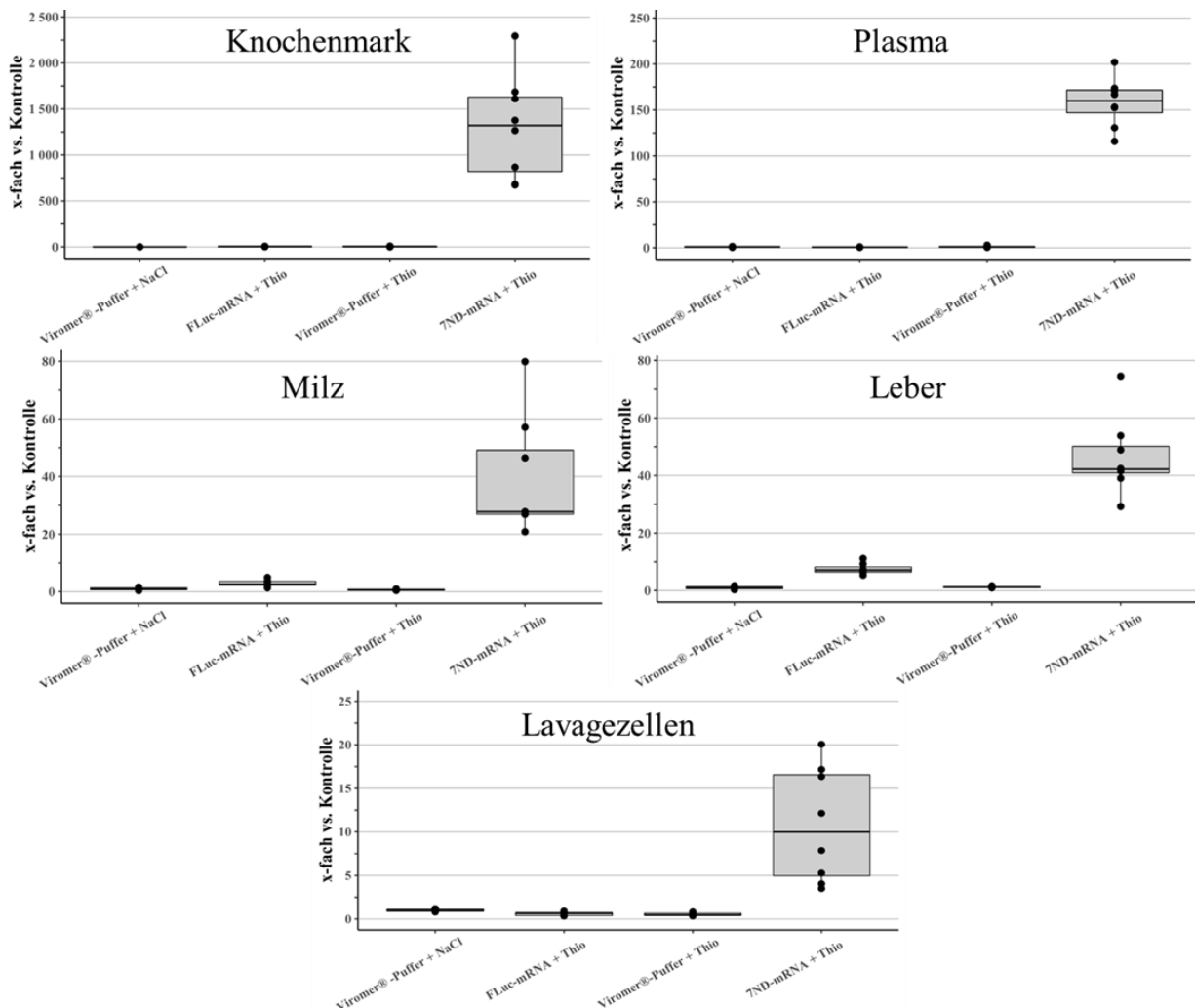


Abb. 28 Biodistribution: Quantifizierung der 7ND-mRNA in verschiedenen Organen

Nach der i.v.-Applikation des Viromer-7ND-mRNA-Komplexes beziehungsweise verschiedener Kontrollen (FLuc-mRNA, Viromer-Puffer) wurde durch die Applikation einer 8 %igen Thioglykolat-Lösung eine Peritonitis ausgelöst. Anschließend wurde in den Proben folgender Organe die 7ND-mRNA-Konzentration gemessen: Knochenmark, Plasma, Milz, Leber, Lavagezellen. Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's *multiple comparison post-hoc*-Test; n= 7.

Ergebnisse

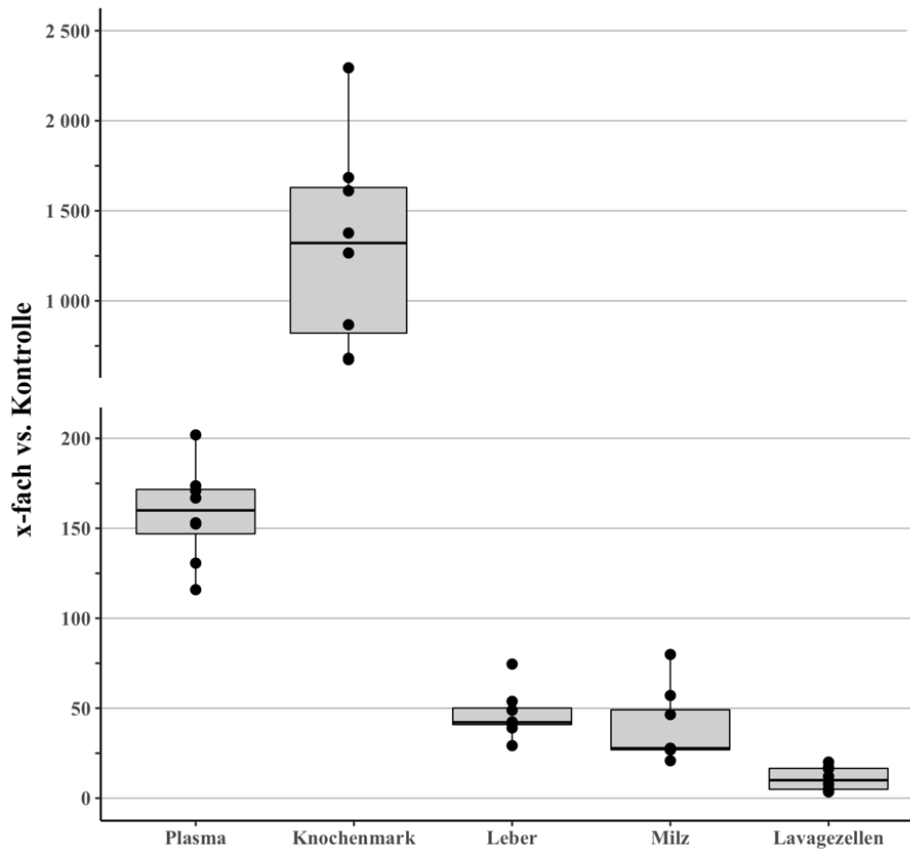


Abb. 29 Biodistribution: Quantifizierung der 7ND-mRNA (vergleichend) in verschiedenen Organen

Vergleich der 7ND-mRNA-Konzentrationen der verschiedenen Organproben der Behandlungsgruppe (Applikation des Viomer-7ND-mRNA-Komplexes): höchste 7ND-mRNA-Konzentration im Knochenmark. Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's *multiple comparison post-hoc*-Test; n = 7.

In allen Proben der Behandlungsgruppe (Applikation des Viomer-7ND-mRNA-Komplexes) war ein Anstieg der 7ND-mRNA-Konzentration im Vergleich zu den Kontrollgruppen (Applikation Viomer-Puffer) nachweisbar. Im Knochenmark konnte dabei die höchste Konzentration der 7ND-mRNA gemessen werden. Die Ergebnisse der mRNA-Quantifizierung wurden mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunn's *multiple comparison post-hoc*-Test statistisch ausgewertet. Es zeigten sich hierbei keine statistisch signifikanten Unterschiede. Auf Grund der geringen Stichprobengröße sollte das nicht signifikante Ergebnis dieser Tests jedoch kritisch betrachtet werden.

4.4 Toxizitätstest: Analyse der Leberenzymaktivitäten AST, ALT und des unspezifischen Toxizitätsmarkers LDH

Nach der Analyse der Verteilung der applizierten mRNA und ihrer Translationsprodukte wurde die Toxizität des Viomer-Nukleinsäure-Komplexes getestet. Als ausschlaggebende Messwerte für die Beurteilung, ob eine Toxizität vorliegt, wurden Plasmaproben auf veränderte Aktivitäten der ALT, AST und LDH nach der Applikation des Viomer-Nukleinsäure-Komplexes im Vergleich zu einem unbehandelten Tier untersucht.

Für den Toxizitätstest wurde den Versuchstieren aus Abschnitt 3.4.4.1 und Abschnitt 3.4.5.1 während der finalen Herzpunktion 300 µl Blut entnommen und die Proben anschließend an das Labor der Medizinischen Tierklinik der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig übergeben. Dort wurde die Aktivität von ALT, AST und LDH als Indikator der Konzentrationen dieser Enzyme im Blut bestimmt. Den Versuchstieren wurde zunächst ein Viomer-7ND-mRNA-Komplex appliziert. Die Ergebnisse sind in Abb. 30 dargestellt.

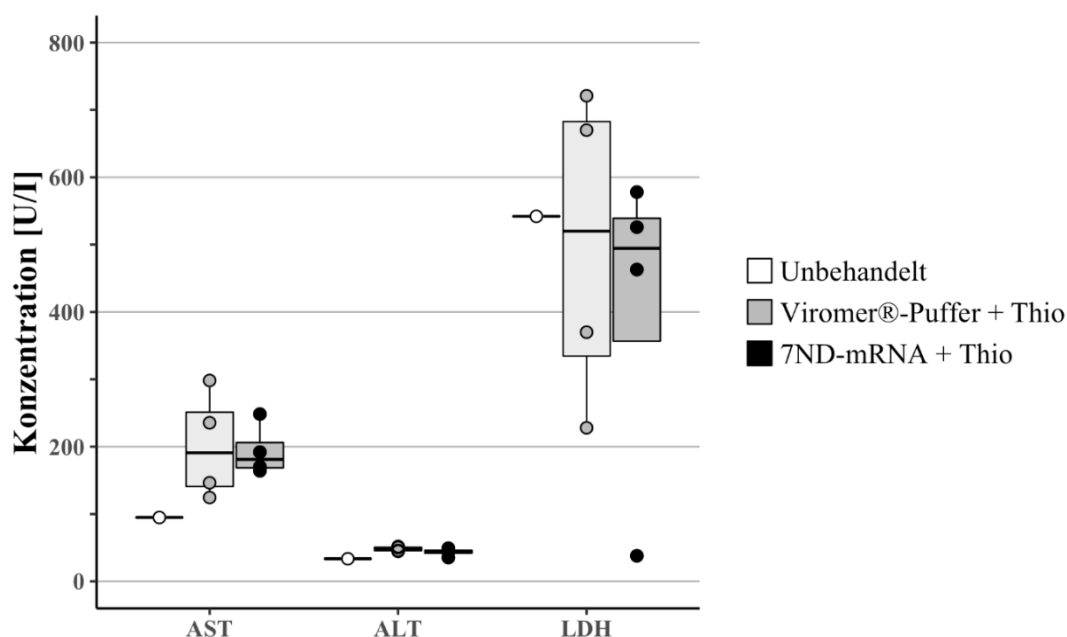


Abb. 30 Toxizitätsanalyse: i.v. Applikation des Viomer-7ND-mRNA-Komplexes

6 Stunden nach der i.v.-Applikation des Viomer-7ND-mRNA-Komplexes beziehungsweise einer Kontrolle (Viomere-Puffer), wurde durch die Applikation einer 8%igen Thioglykolat-Lösung eine Peritonitis induziert. Nach 4 Stunden wurden die Enzymaktivitäten AST, ALT und LDH im Plasma der Tiere gemessen. Die ALT- und LDH-Werte waren zwischen der Kontroll- und der Behandlungsgruppe vergleichbar. Der AST-Wert war in der Kontroll- und Behandlungsgruppe im Vergleich zu dem unbehandelten Tier erhöht. Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's multiple comparison post-hoc-Test; n = 4 (unbehandelt n = 1).

Die Enzymaktivitäten ALT und LDH der Tiere aus der Behandlungsgruppe waren mit denen der Kontrollgruppe und denen des unbehandelten Tieres vergleichbar. Die Enzymaktivität der AST der Tiere aus der Behandlungsgruppe und der Kontrollgruppe waren im Vergleich zu dem des unbehandelten Tieres erhöht.

Ergebnisse

Darauffolgend wurde den Versuchstieren der ebenfalls zu analysierende Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplex appliziert. Die Blutproben dieser Tiere wurden äquivalent analysiert. Die Serum-ALT-Aktivitäten der Tiere aus der Behandlungsgruppe waren mit denen der Kontrollgruppe und des unbehandelten Tieres vergleichbar. Jedoch waren die AST-Aktivitäten der Behandlungs- und Kontrollgruppe im Vergleich zu dem unbehandelten Tier erhöht. Die LDH-Serumaktivität der Behandlungsgruppe war im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen erhöht (siehe Abb. 31). Die Ergebnisse der Toxizitätsanalyse wurden mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunn's *multiple comparison post-hoc*-Test statistisch ausgewertet.

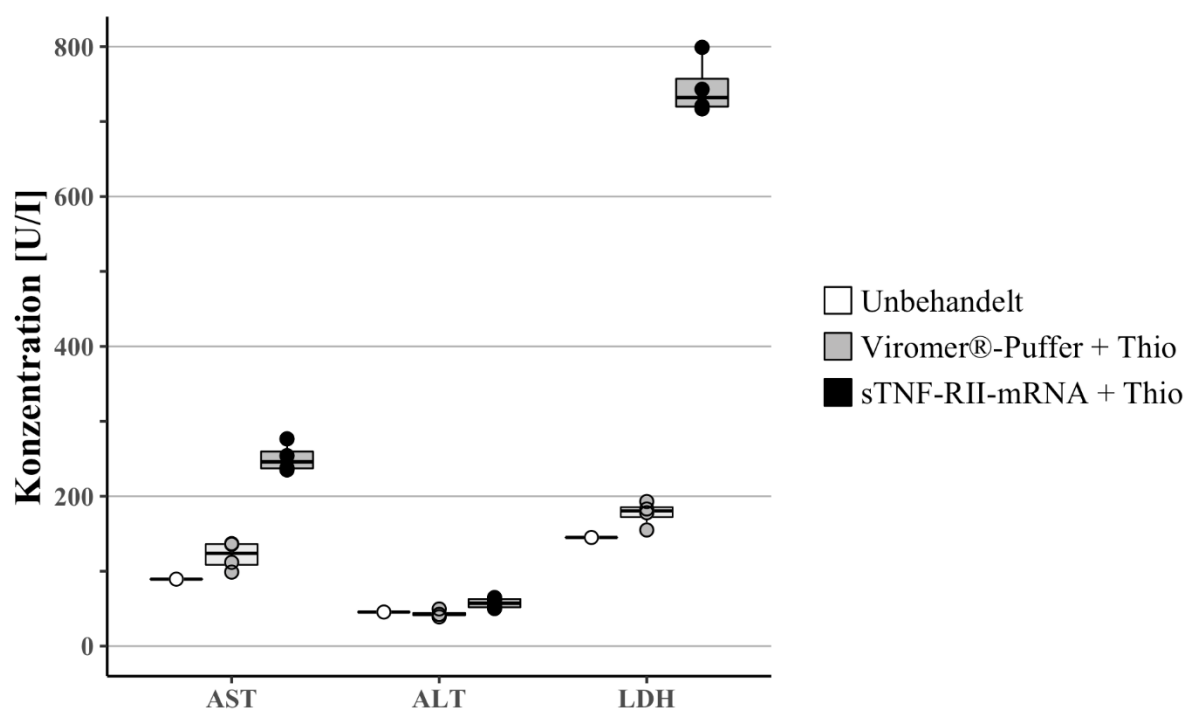


Abb. 31 Toxizitätsanalyse: i.v.-Applikation des Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes

6 Stunden nach der i.v.-Applikation des Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes beziehungsweise einer Kontrolle (Viomers-Puffer) wurde durch die Applikation einer 8%igen Thioglykolat-Lösung eine Peritonitis induziert. Nach 4 Stunden wurden die Aktivitäten der AST, ALT und LDH im Plasma der Tiere gemessen. Die Serum-ALT-Aktivität war zwischen der Kontroll- und der Behandlungsgruppe vergleichbar. Die AST-Aktivitäten der Tiere aus der Behandlungsgruppe war gegenüber den Kontrolltieren erhöht. Die LDH-Serumaktivitäten der Tiere aus der Behandlungsgruppe waren gegenüber den Kontrolltieren erhöht. Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's *multiple comparison post-hoc*-Test; n = 4 (unbehandelt n = 1).

4.5 Effektivität des zu testenden Viromer-7ND-mRNA-Komplexes im Modell der Thioglykolat-induzierten Peritonitis

Nach der Etablierung der Thioglykolat-induzierten Peritonitis und dem Ausschließen einer Toxizität des gewählten Viromer-Nukleinsäure-Komplexes, sollte anschließend gezeigt werden, dass sich die Ergebnisse aus der Zellkultur auf den Gesamtorganismus übertragen lassen. Dafür wurde zuerst der Viromer-7ND-mRNA-Komplex getestet, um dessen Effizienz bezüglich der Inhibierung der Infiltration von Monozyten und Granulozyten in das *Peritoneum* zu überprüfen. Dabei wurde die infiltrierende Monozyten- und Granulozytenzahl bestimmt und innerhalb der Versuchsgruppen verglichen.

4.5.1 Intravenöse Applikation des Viromer-7ND-mRNA-Komplexes

Den Versuchstieren wurde hierzu der Viromer-7ND-mRNA-Komplex i.v. appliziert und 6 Stunden später durch die i.p.-Applikation einer 8 %igen Thioglykolat-Lösung eine Peritonitis ausgelöst (siehe 3.4.4). Nach 4 Stunden wurde eine *Peritoneallavage* durchgeführt und die anschließend gewonnenen Zellen mittels FACS analysiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 32 dargestellt.

Ergebnisse

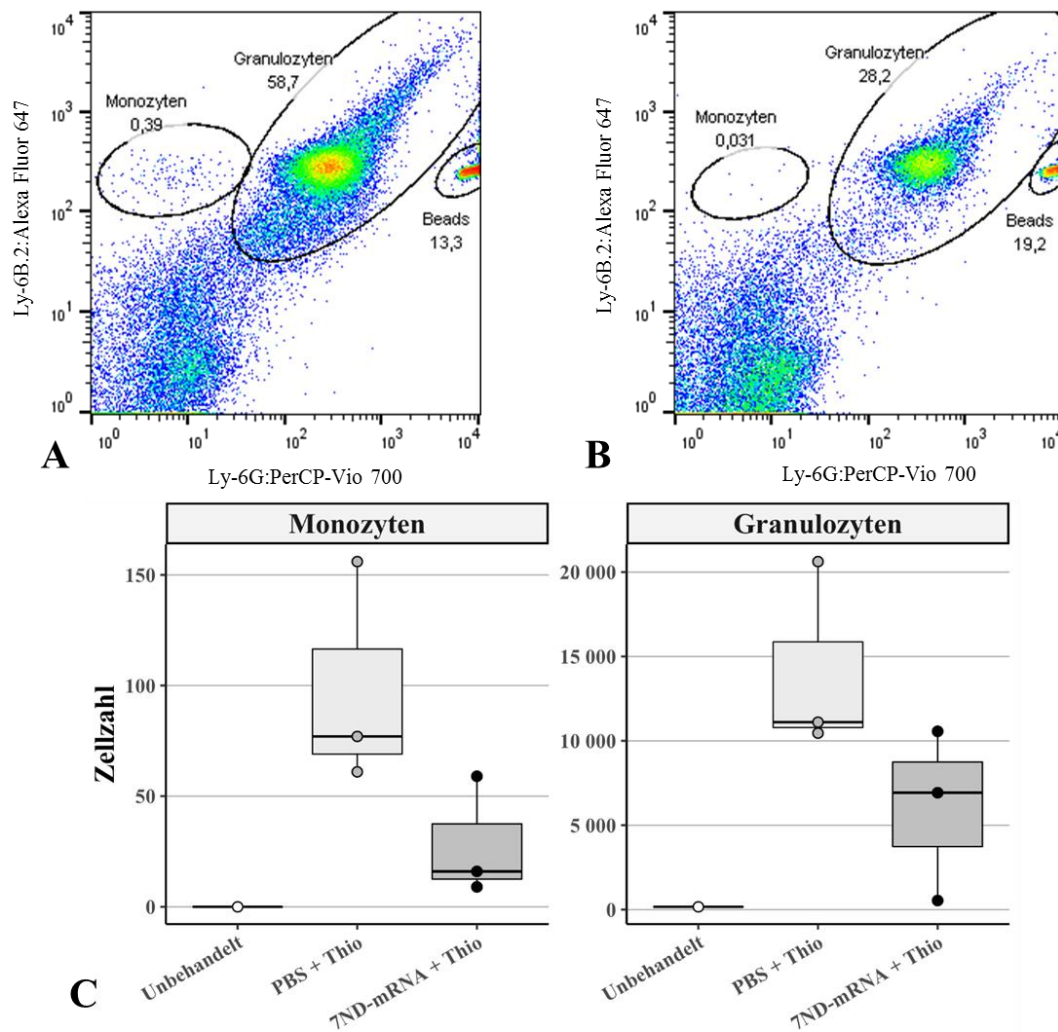


Abb. 32 Effektivität des Viromer-7ND-mRNA-Komplexes nach intravenöser Applikation

Darstellung der Ergebnisse der FACS-Analyse mittels *Dot Plot*. Die Bereiche der Monozyten, Granulozyten und der *Beads* sind gekennzeichnet und der entsprechende prozentuale Anteil der jeweiligen Zellpopulation an der insgesamt gemessenen Zellzahl angegeben. A: Analyse der in der *Peritoneallavageflüssigkeit* enthaltenen Immunzellen nach i.v.-Applikation von PBS und Auslösen einer Thioglykolat-induzierten Peritonitis. B: Analyse der in der *Peritoneallavageflüssigkeit* enthaltenen Immunzellen nach i.v.-Applikation des Viromer-7ND-mRNA-Komplexes und Auslösen einer Thioglykolat-induzierten Peritonitis. C: Quantifizierung der analysierten Zellen: Reduktion der infiltrierenden Monozyten- und Granulozytenzahl in der *Peritoneallavageflüssigkeit* der Behandlungsgruppe (7ND-mRNA + Thio) im Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS + Thio). Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's *multiple comparison post-hoc*-Test; n = 3 (unbehandelt n = 1).

Abb. 32 zeigt eine erhöhte Anzahl von Monozyten- und Granulozyten in Thioglykolat-behandelten Tieren im Vergleich zu unbehandelten Tieren. In Versuchstieren, die mit Thioglykolat behandelt wurden und gleichzeitig den Viromer-7ND-mRNA-Komplex erhielten, war dagegen eine reduzierte Anzahl von infiltrierenden Immunzellen zu beobachten.

Weiterhin wurde der Überstand der Lavageproben und das Plasma mittels Bio-Plex analysiert (siehe 3.5). Eine repräsentative Auswahl der Ergebnisse der am stärksten veränderten Mediatoren ist in Abb. 33 dargestellt.

Ergebnisse

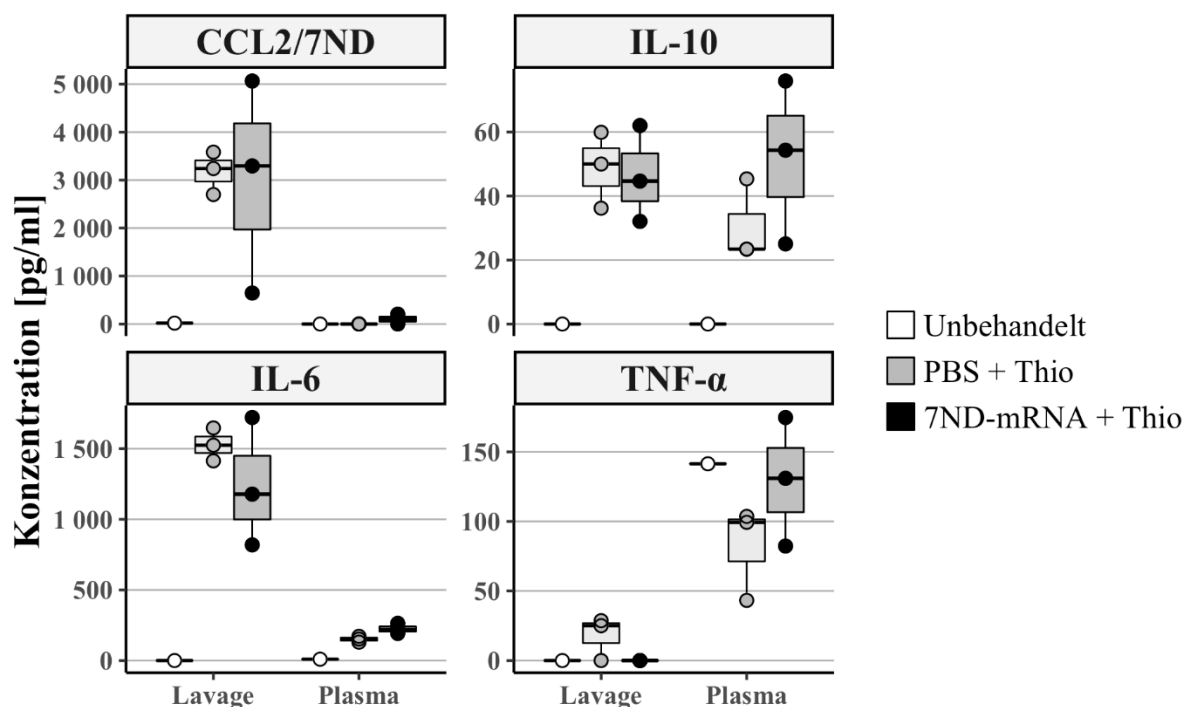


Abb. 33 Bio-Plex-Analyse des Überstandes der Peritoneallavageproben und Plasmaproben nach intravenöser Applikation des Viomer-7ND-mRNA-Komplexes

Es ist die Bestimmung von 4 Zytokinen in Plasma- und Lavageproben mittels Bio-Plex-Analyse dargestellt. CCL2/7ND: die CCL2/7ND-Konzentration ist in der Lavageflüssigkeit der Kontroll- und Behandlungsgruppe im Vergleich zum unbehandelten Tier erhöht, vergleichbare CCL2/7ND-Konzentrationen im Plasma aller Gruppen. IL-10: erhöhte IL-10-Konzentration sowohl in der Lavageflüssigkeit der Kontroll- und Behandlungsgruppe, als auch im Plasma. IL-6: erhöhte IL-6-Konzentration sowohl in der Lavageflüssigkeit der Kontroll- und Behandlungsgruppe, als auch im Plasma. TNF-α: erhöhte TNF-α-Konzentration in Lavageproben der Kontrollgruppe im Vergleich zum unbehandelten Tier und der Behandlungsgruppe. Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's multiple comparison post-hoc-Test; n = 3 (unbehandelt n = 1).

Die Konzentrationen von CCL2/7ND, IL-10 und IL-6 waren in den Überständen der Peritoneallavageproben der mit Viomer-7ND-mRNA-Komplex-behandelten Tiere im Vergleich zu der Kontrollgruppe und dem unbehandelten Tier erhöht. Die TNF-α-Konzentration war dagegen in den Überständen der Peritoneallavageproben der Kontrollgruppe im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen erhöht.

Im Plasma kam es zu einem Anstieg von IL-10 und IL-6 in der Behandlungsgruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe, wohingegen die CCL2/7ND-Konzentrationen zwischen Kontrollgruppe und Behandlungsgruppe vergleichbar waren. Die Konzentration von TNF-α im Plasma war in der Kontrollgruppe gegenüber dem unbehandelten Tier und der Behandlungsgruppe reduziert. Die statistische Analyse der am stärksten regulierten Zytokine wurde mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunn's multiple comparison post-hoc-Test durchgeführt. Für die Ergebnisse der weniger stark regulierten Zytokine sei auf die Tab. 48 und Tab. 49 im Anhang verwiesen.

4.5.2 Reproduzierbarkeit der intravenösen Applikation des Viomer-7ND-mRNA-Komplexes

In einem Wiederholungsversuch wurde den Versuchstieren wiederum der Viomer-7ND-mRNA-Komplex i.v. appliziert und durch die Applikation einer 8 %igen Thioglykolat-Lösung eine Peritonitis ausgelöst (siehe 3.4.4.2). Nach einer *Peritoneallavage* wurden die gewonnenen Zellen mittels Durchflusszytometrie analog analysiert, die Ergebnisse sind in Abb. 34 gezeigt.

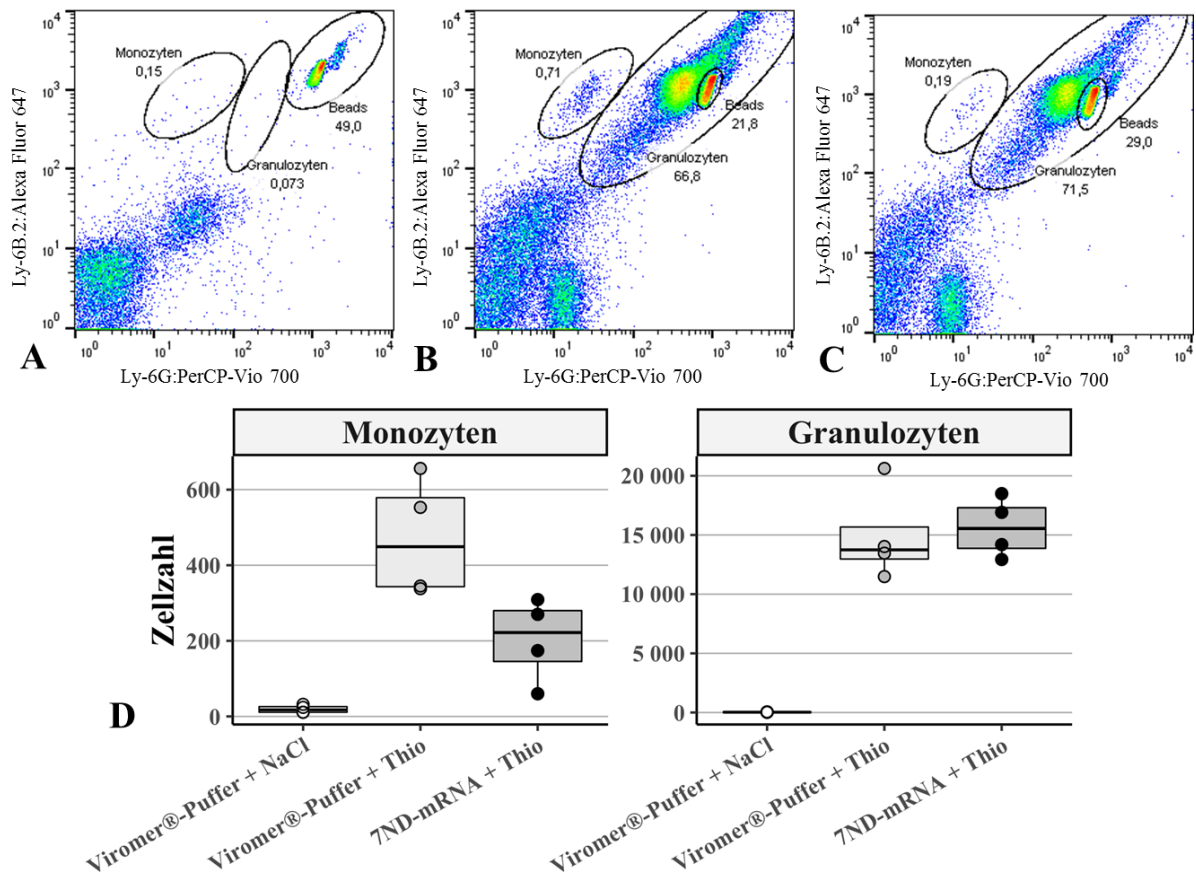


Abb. 34 Reproduzierbarkeit der i.v.-Applikation des Viomer-7ND-mRNA-Komplexes

Darstellung der Ergebnisse der FACS-Analyse mittels *Dot Plot*. Die Bereiche der Monozyten, Granulozyten und *Beads* sind gekennzeichnet und der entsprechende prozentuale Anteil der jeweiligen Zellpopulation an der insgesamt gemessenen Zellzahl angegeben. A: Analyse der in der *Peritoneallavageflüssigkeit* enthaltenen Immunzellen nach i.v.-Applikation des Viomer-Puffers ohne das Auslösen einer Thioglykolat-induzierten Peritonitis. B: Analyse der in der *Peritoneallavageflüssigkeit* enthaltenen Immunzellen nach i.v.-Applikation des Viomer-Puffers und Auslösen einer Thioglykolat-induzierten Peritonitis. C: Analyse der in der *Peritoneallavage* enthaltenen Immunzellen nach i.v.-Applikation des Viomer-7ND-mRNA-Komplexes und Auslösen einer Thioglykolat-induzierten Peritonitis. D: Quantifizierung der analysierten Zellen: die Monozytenzahl in der *Peritoneallavage* der Behandlungsgruppe (7ND-mRNA + Thio) war im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Vomer-Puffer + Thio) geringer; die Granulozytenzahl war in der *Peritoneallavageflüssigkeit* der Behandlungsgruppe (7ND-mRNA + Thio) und der Kontrollgruppe (Vomer-Puffer + Thio) vergleichbar. Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's *multiple comparison post-hoc*-Test; n = 4.

Mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunn's *multiple comparison post-hoc*-Test wurden die Ergebnisse der Zell-Quantifizierung statistisch ausgewertet.

Ergebnisse

Die erhöhte Infiltration von Monozyten und Granulozyten in das *Peritoneum* der Tiere aus der Kontrollgruppe (Applikation Viomer-Puffer + Thio) gegenüber den Tieren der unbehandelten Gruppe konnte in den analysierten *Peritoneallavagen* bestätigt und damit reproduziert werden. Auch die reduzierte Monozyteninfiltration in das *Peritoneum* der Tiere aus der Behandlungsgruppe (Applikation des Viomer-7ND-mRNA-Komplex + Thio) konnte in den analysierten *Peritoneallavagen* im Vergleich zu den Lavageproben der Kontrollgruppe (Applikation des Viomer-Puffers + Thio) nachgewiesen und gleichsam reproduziert werden (siehe Abb. 34). Die zuvor detektierte Reduktion der Granulozyteninfiltration bei der Behandlungsgruppe (Applikation des Viomer-7ND-mRNA-Komplexes + Thio) gegenüber der Kontrollgruppe (Applikation des Viomer-Puffers + Thio) konnte in den Lavagproben des Wiederholungsversuchs jedoch nicht erneut nachgewiesen werden.

Um einen Überblick über die wichtigsten Entzündungsparameter zu bekommen, wurden die Überstände der Lavageproben und das Plasma mittels Bio-Plex analysiert (siehe 3.5). Eine repräsentative Auswahl der am stärksten veränderten Zytokine ist in Abb. 35 dargestellt.

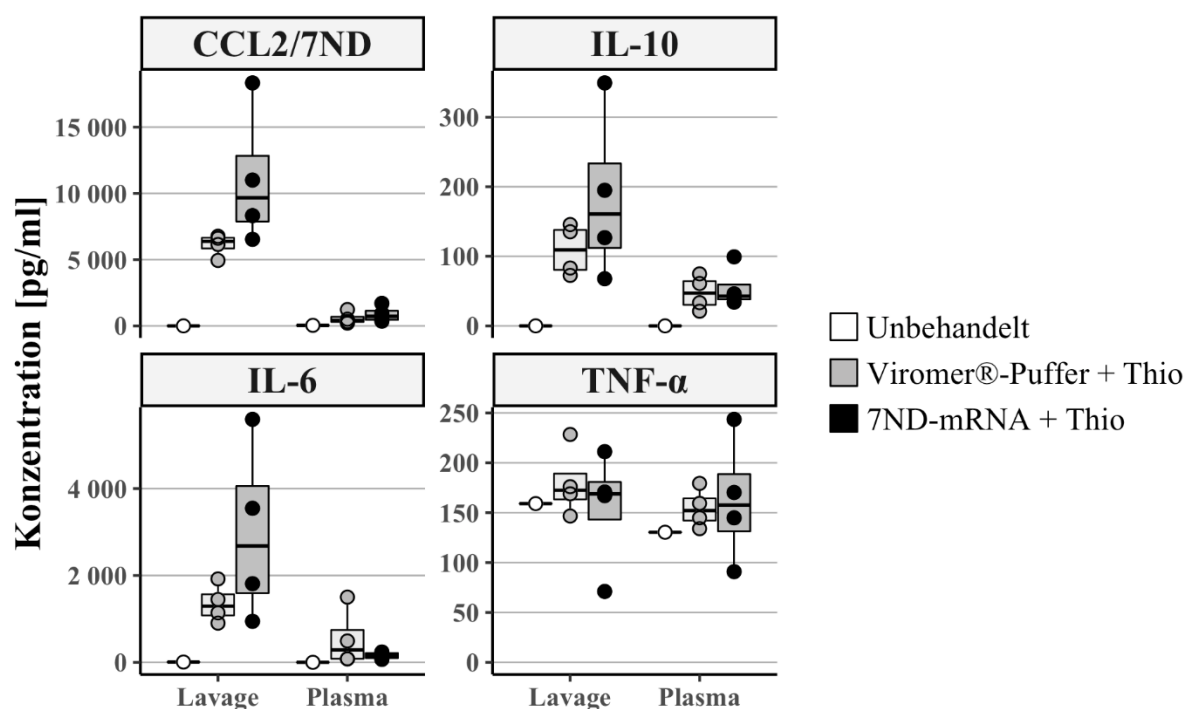


Abb. 35 Bio-Plex-Analyse des Überstandes der *Peritoneallavageproben* und *Plasmaproben* nach Reproduktion der i.v. Applikation des Viomer-7ND-mRNA-Komplexes

Die Konzentration von 4 Zytokinen in Plasma- und *Peritoneallavageproben* ist dargestellt. CCL2/7ND: erhöhte CCL2/7ND-Konzentration in der Lavageflüssigkeit der Behandlungsgruppe und der Kontrollgruppe, vergleichbare Konzentrationen im Plasma aller Gruppen. IL-10: erhöhte IL-10-Konzentration in der Lavage und im Plasma der Kontrollgruppe und in der Behandlungsgruppe. IL-6: erhöhte IL-6-Konzentration in der Lavage der Kontrollgruppe und der Behandlungsgruppe, vergleichbare Konzentration im Plasma aller Gruppen. TNF-α: vergleichbare Konzentration im Plasma aller Gruppen, erhöhte TNF-α-Konzentration im Plasma der Kontrollgruppe und der Behandlungsgruppe. Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's *multiple comparison post-hoc*-Test; n = 4 (unbehandelt n = 1).

In den Überständen der *Peritoneallavageproben* der Viomer-Komplex-behandelten Tiere kam zu einem Anstieg von CCL2/7ND, IL-10 und IL-6 im Vergleich zu der Kontrollgruppe und dem unbehandelten Tier. Die Konzentration von TNF- α in der *Peritoneallavage* war in allen Gruppen vergleichbar.

Die Konzentration von IL-10 und TNF- α im Plasma stieg in der Behandlungsgruppe und in der Kontrollgruppe, im Vergleich zu dem unbehandelten Tier an. Wohingegen die Messwerte für CCL2/7ND und IL-6 im Plasma auf vergleichbare Konzentrationen zwischen unbehandeltem Tier, Kontroll- und Behandlungsgruppe hinweisen.

Für die weniger stark regulierten Zytokine sei auf die Tab. 50 und Tab. 51 im Anhang verwiesen.

4.5.3 Effektivität des Viomer-FLuc-mRNA-Komplexes im Modell der Thioglykolat-induzierten Peritonitis

Nach der Analyse der Effektivität des Viomer-7ND-mRNA-Komplexes, wurde eine Kontroll-mRNA (in diesem Fall eine FLuc-mRNA, siehe 3.3) verwendet, um eine Eigenwirkung der verwendeten Viomere auszuschließen.

Den Versuchstieren wurde der Viomer-FLuc-mRNA-Komplex i.v. appliziert und 6 Stunden später durch die Applikation einer 8 %igen Thioglykolat-Lösung eine Peritonitis ausgelöst (siehe 3.4.4.2). Nach 4 Stunden wurde eine *Peritoneallavage* durchgeführt und die so gewonnenen Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Ergebnisse

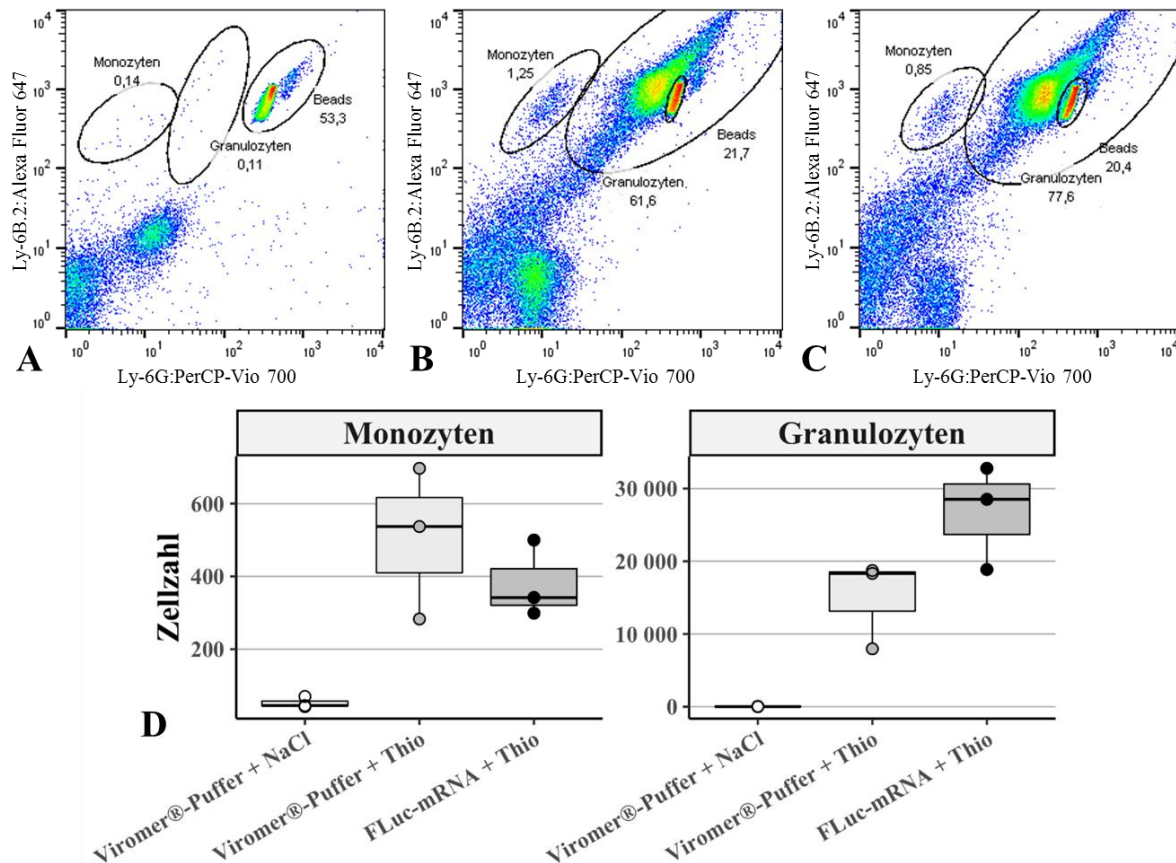


Abb. 36 Effekt des Viomer-FLuc-mRNA-Komplexes auf die Immunzellinfiltration

Darstellung der Ergebnisse der FACS-Analyse mittels Dot Plot. Die Bereiche der Monozyten, Granulozyten und *Beads* sind gekennzeichnet und der entsprechende prozentuale Anteil der jeweiligen Zellpopulation an der insgesamt gemessenen Zellzahl angegeben. A: Analyse der in der *Peritoneallavageflüssigkeit* enthaltenen Immunzellen nach i.v.-Applikation des Viomer-Puffers ohne das Auslösen einer Thioglykolat-induzierten Peritonitis. B: Analyse der in der *Peritoneallavageflüssigkeit* enthaltenen Immunzellen nach i.v.-Applikation des Viomer-Puffers und Auslösen einer Thioglykolat-induzierten Peritonitis. C: Analyse der in der *Peritoneallavageflüssigkeit* enthaltenen Immunzellen nach i.v.-Applikation des Viomer-FLuc-mRNA-Komplexes und Auslösen einer Thioglykolat-induzierten Peritonitis. D: Quantifizierung der analysierten Zellen: Die Monozytenzahl in der *Peritoneallavage* der Behandlungsgruppe (FLuc-mRNA + Thio) war im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Viomer-Puffer + Thio) reduziert. Die Granulozytenzahl in der *Peritoneallavage* der Behandlungsgruppe (FLuc-mRNA + Thio) war im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Viomer-Puffer + Thio) erhöht. Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's *multiple comparison post-hoc*-Test; n = 3.

In Abb. 36 ist zu erkennen, dass die Monozyten- und Granulozytenzahl in der Gruppe Viomer-Puffer + Thio (Induktionskontrolle) im Vergleich zu den *Peritoneallavageproben* der unbehandelten Gruppe erhöht war. Die Infiltration der Monozyten in das *Peritoneum* der Tiere aus der Behandlungsgruppe (Applikation des Viomer-FLuc-mRNA-Komplexes + Thio) war im Vergleich zu den *Peritoneallavageproben* der Kontrollgruppe (Applikation des Viomer-Puffers + Thio) reduziert. Die Infiltration der Granulozyten in das *Peritoneum* der Tiere aus der Behandlungsgruppe (Applikation des Viomer-FLuc-mRNA-Komplexes + Thio) war dagegen im Vergleich zu den *Peritoneallavageproben* der Kontrollgruppe (Applikation des Viomer-Puffers + Thio) erhöht. Die Ergebnisse wurden mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunn's *multiple comparison post-hoc*-Test statistisch analysiert.

Eine repräsentative Auswahl der Ergebnisse, der parallel durchgeführten Zytokinanalysen ist in Abb. 37 dargestellt.

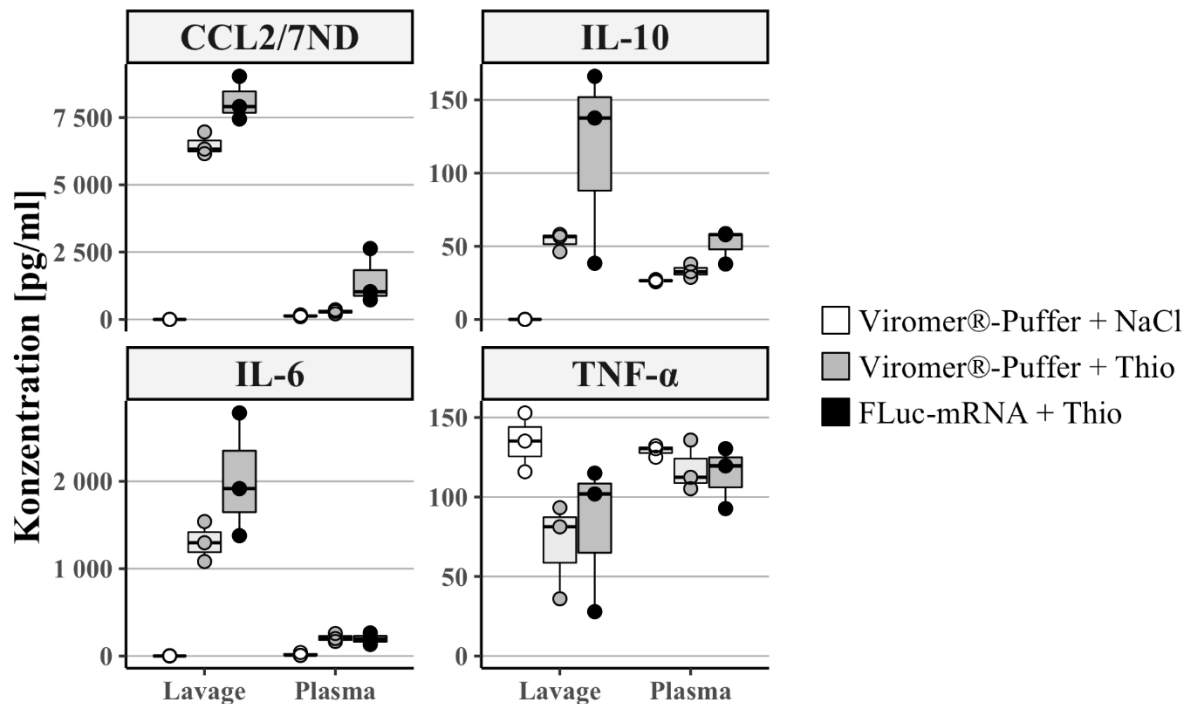


Abb. 37 Bio-Plex-Analyse des Überstandes der Peritoneallavageproben und Plasmaproben nach intravenöser Applikation des Viromer-FLuc-mRNA-Komplexes

Die Konzentration von 4 ausgewählten Zytokinen in Plasma- und Lavageproben ist dargestellt. CCL2/7ND: erhöhte CCL2/7ND-Konzentration in Lavageproben der Kontrollgruppe und der Behandlungsgruppe, erhöhte Konzentration im Plasma der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. IL-10: erhöhte IL-10-Konzentrationen in Lavageproben der Kontroll- und Behandlungsgruppe; erhöhte Konzentration im Plasma der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. IL-6: erhöhte IL-6-Konzentrationen in Lavageproben der Kontrollgruppe und der Behandlungsgruppe, erhöhte Konzentrationen im Plasma der Behandlungsgruppe und der Kontrollgruppe. TNF- α : reduzierte TNF- α -Konzentrationen in Lavageproben und im Plasma der Kontrollgruppe sowie der Behandlungsgruppe. Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's *multiple comparison post-hoc*-Test; $n = 3$.

Wie zu erkennen, kam es in den Überständen der *Peritoneallavageproben* der Viromer-Komplex-behandelten Tiere zu einem Anstieg von CCL2/7ND, IL-10 und IL-6 im Vergleich zu dem unbehandelten Tier und der Kontrollgruppe. Die Konzentration von TNF- α war in Lavageproben der Kontrollgruppe und der Behandlungsgruppe im Vergleich zum unbehandelten Tier hingegen reduziert.

Im Plasma kam es zu einem Anstieg von CCL2/7ND und IL-10 in der Behandlungsgruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe und dem unbehandelten Tier. Wohingegen die Messwerte für IL-6 auf vergleichbare Konzentrationen zwischen Kontrollgruppe und Behandlungsgruppe hinweisen. Die Messwerte für TNF- α waren im Plasma der Kontrollgruppe und der Behandlungsgruppe im Vergleich zum unbehandelten Tier reduziert. Für die weniger stark regulierten Zytokine sei auf die Tab. 52 und Tab. 53 im Anhang verwiesen.

4.5.4 Intraperitoneale Applikation des Viromer-7ND-mRNA-Komplexes

Alternativ zu den durchgeführten i.v.-Applikationen, wurde den Versuchstieren in diesem Versuchsabschnitt der Viromer-7ND-mRNA-Komplex i.p. appliziert und 6 Stunden später durch die Applikation einer 8 %igen Thioglykolat-Lösung eine Peritonitis ausgelöst (siehe 3.4.4.3). Nach 4 Stunden wurde eine *Peritoneallavage* durchgeführt und die so gewonnenen Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert.

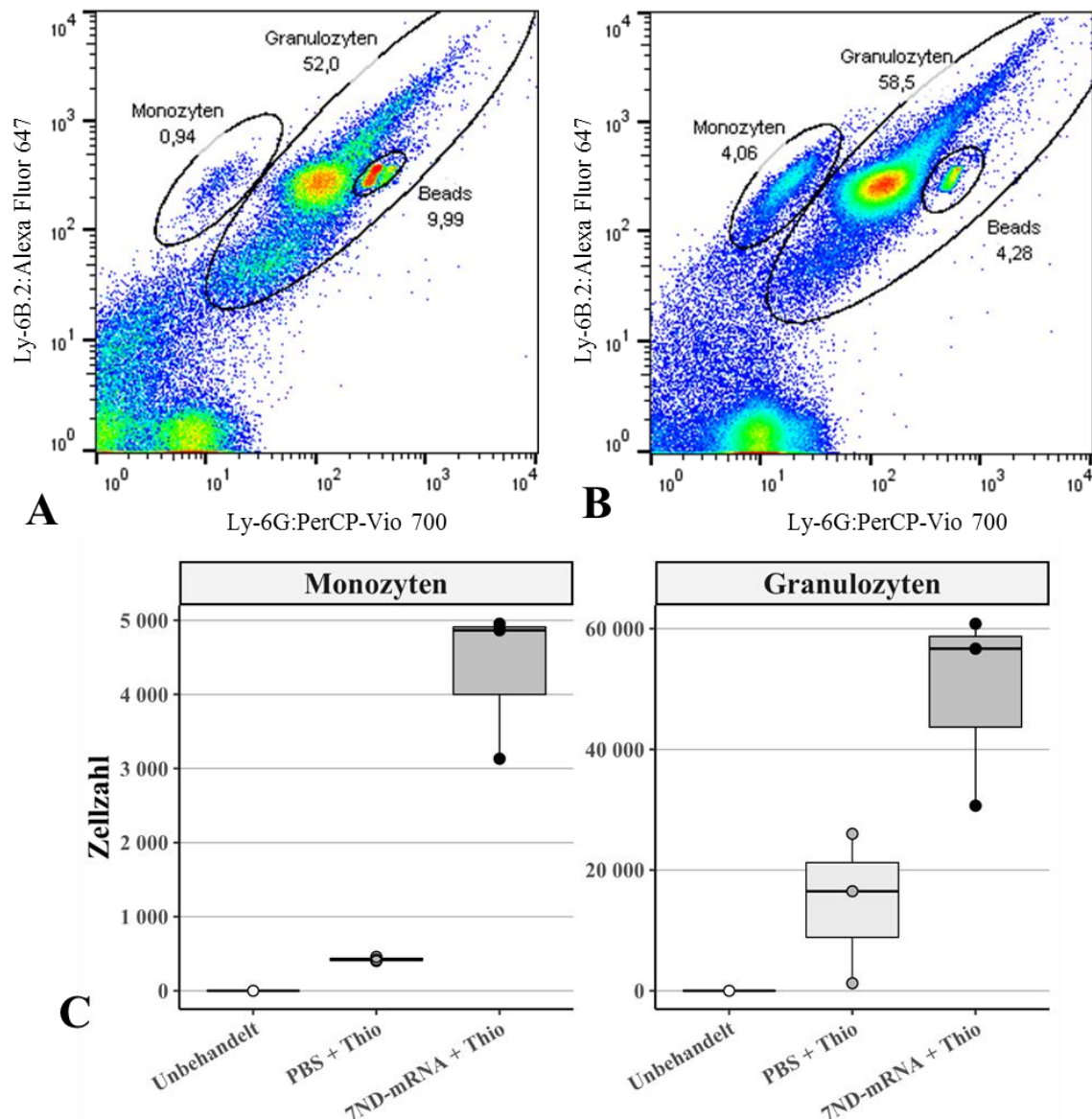


Abb. 38 Effektivität des Viromer-7ND-mRNA-Komplexes nach intraperitonealer Applikation

Darstellung der Ergebnisse der FACS-Analyse mittels *Dot Plot*. Die Bereiche der Monozyten, Granulozyten und *Beads* sind gekennzeichnet und der entsprechende prozentuale Anteil der jeweiligen Zellpopulation an der insgesamt gemessenen Zellzahl angegeben. A: Analyse der in der *Peritoneallavage* enthaltenen Immunzellen nach i.p.-Applikation von PBS und Auslösen einer Thioglykolat-induzierten Peritonitis. B: Analyse der in der *Peritoneallavageflüssigkeit* enthaltenen Immunzellen nach i.p.-Applikation des Viromer-7ND-mRNA-Komplexes und Auslösen einer Thioglykolat-induzierten Peritonitis. C: Quantifizierung der analysierten Zellen: Erhöhung der Monozyten- und Granulozytenzahl in der *Peritoneallavageflüssigkeit* der Behandlungsgruppe (7ND-mRNA + Thio) im Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS + Thio) und der unbehandelten Gruppe. Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's multiple comparison post-hoc-Test; n = 3 (unbehandelt n = 1).

Die Zahl der infiltrierenden Monozyten und Granulozyten, die in *Peritoneallavageproben* der Kontrollgruppe (Applikation von PBS + Thio) detektiert werden konnten, war im Vergleich zur Analyse der *Peritoneallavageflüssigkeit* der unbehandelten Gruppe erhöht. Die Zahl der infiltrierenden Monozyten und Granulozyten in der *Peritoneallavageflüssigkeit* der Behandlungsgruppe (Applikation des Viomer-7ND-mRNA-Komplexes + Thio) war im Vergleich zur analysierten *Peritoneallavage* der Kontrollgruppe (Applikation von PBS + Thio) erhöht (Abb. 38). Die Ergebnisse der Quantifizierung der analysierten Zellen wurden mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunn's *multiple comparison post-hoc*-Test statistisch ausgewertet.

4.5.5 Vergleich intraperitoneale und intravenöse Applikation des Viomer-7ND-mRNA-Komplexes

Beim Vergleich der Abb. 32 und Abb. 38 ist zu erkennen, dass bei verschiedenen Applikationsrouten unterschiedliche Monozyten- bzw. Granulozytenzahlen in den Lavageproben der einzelnen Versuchsgruppen nachgewiesen werden konnten. Diese Ergebnisse sind in Abb. 39 zusammengefasst. Die Unterschiede in den analysierten Zellzahlen weisen auf eine abweichende Größenordnung der Aktivierung der Monozyten- bzw. Granulozyteninfiltration hin. Beim Vergleich der Monozyteninfiltration fiel auf, dass die Infiltration innerhalb der Kontrollgruppen bei einer i.p.-Applikation höher war als nach der i.v.-Applikation von PBS. Des Weiteren war die Monozyteninfiltration in den Behandlungsgruppen (7ND-mRNA + Thio) nach der i.p.-Applikation höher, als nach i.v.-Applikation.

Beim Vergleich der Granulozyteninfiltration fiel auf, dass die Infiltration innerhalb der Kontrollgruppen bei einer i.p.-Applikation höher war als nach der i.v.-Applikation von PBS. In den Behandlungsgruppen (7ND-mRNA + Thio) war die Granulozyteninfiltration nach der i.p.-Applikation im Vergleich zur i.v.-Applikation deutlich erhöht. Durch die geringe Stichprobengröße innerhalb der Versuchsgruppen sind die statistisch nicht signifikanten Unterschiede (Mann-Whitney-Test) kritisch zu betrachten.

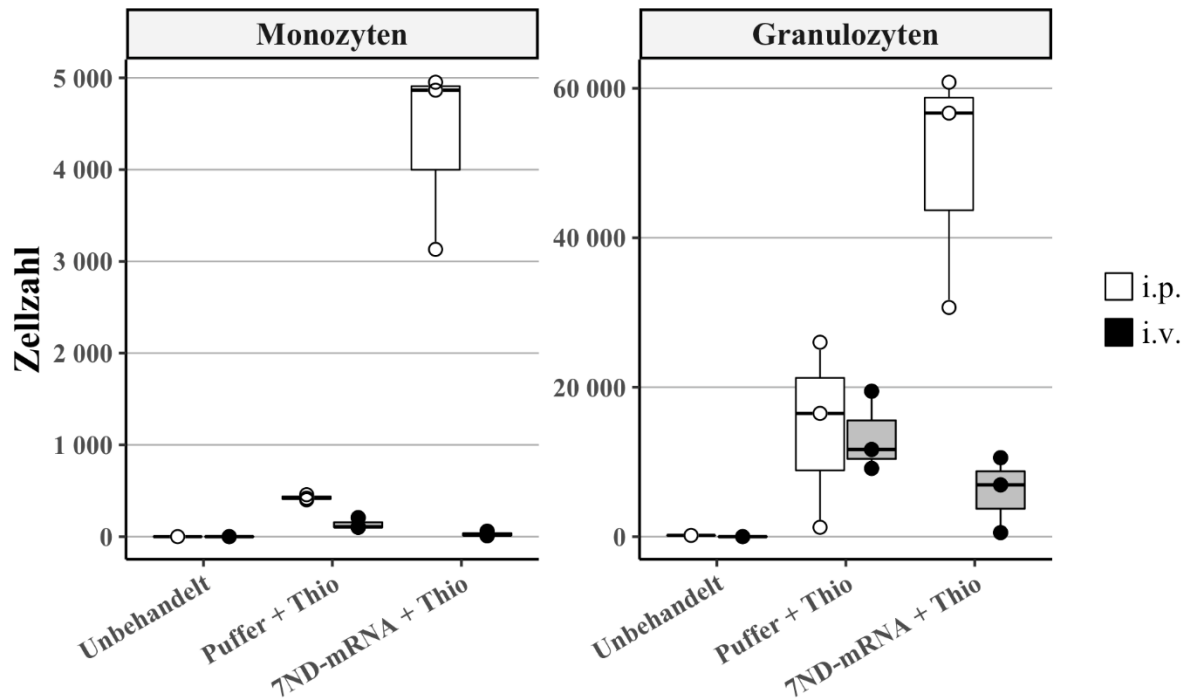


Abb. 39 Vergleich intraperitoneale und intravenöse Applikation des Viomer-7ND-mRNA-Komplexes

Die Monozytenzahl in der Kontrollgruppe war nach der i.p.-Applikation von PBS im Vergleich zur i.v.-Applikation von PBS erhöht. Die Monozytenzahl war nach der i.p.-Applikation des Viomer-7ND-mRNA-Komplexes im Vergleich zur i.v.-Applikation erhöht. Die Granulozytenzahl in der Kontrollgruppe war nach der i.p.-Applikation von PBS im Vergleich zur i.v.-Applikation von PBS erhöht. Die Granulozytenzahl war nach i.p.-Applikation des Viomer-7ND-mRNA-Komplexes im Vergleich zur i.v.-Applikation erhöht. Mann-Whitney-Test; n = 3-4 (unbehandelt n = 1).

4.6 Effektivität des zu testenden Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes im Modell der Thioglykolat-induzierten Peritonitis

Nach Analyse der Effektivität des Viomer-7ND-mRNA-Komplexes wurde der Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplex getestet, um dessen Wirksamkeit bezüglich des Einflusses auf die Infiltration von Immunzellen in das *Peritoneum* zu analysieren. Dafür wurde, wie in vorhergehenden Experimenten, die Monozyten- und Granulozyteninfiltration analysiert und verglichen.

4.6.1 Intravenöse Applikation des Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes

Den Versuchstieren wurde hierzu der Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplex i.v. appliziert und 6 Stunden später durch die Applikation einer 8 %igen Thioglykolat-Lösung eine Peritonitis ausgelöst (siehe 3.4.5.1). Nach 4 Stunden wurde eine *Peritoneallavage* durchgeführt und die so gewonnenen Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Ergebnisse

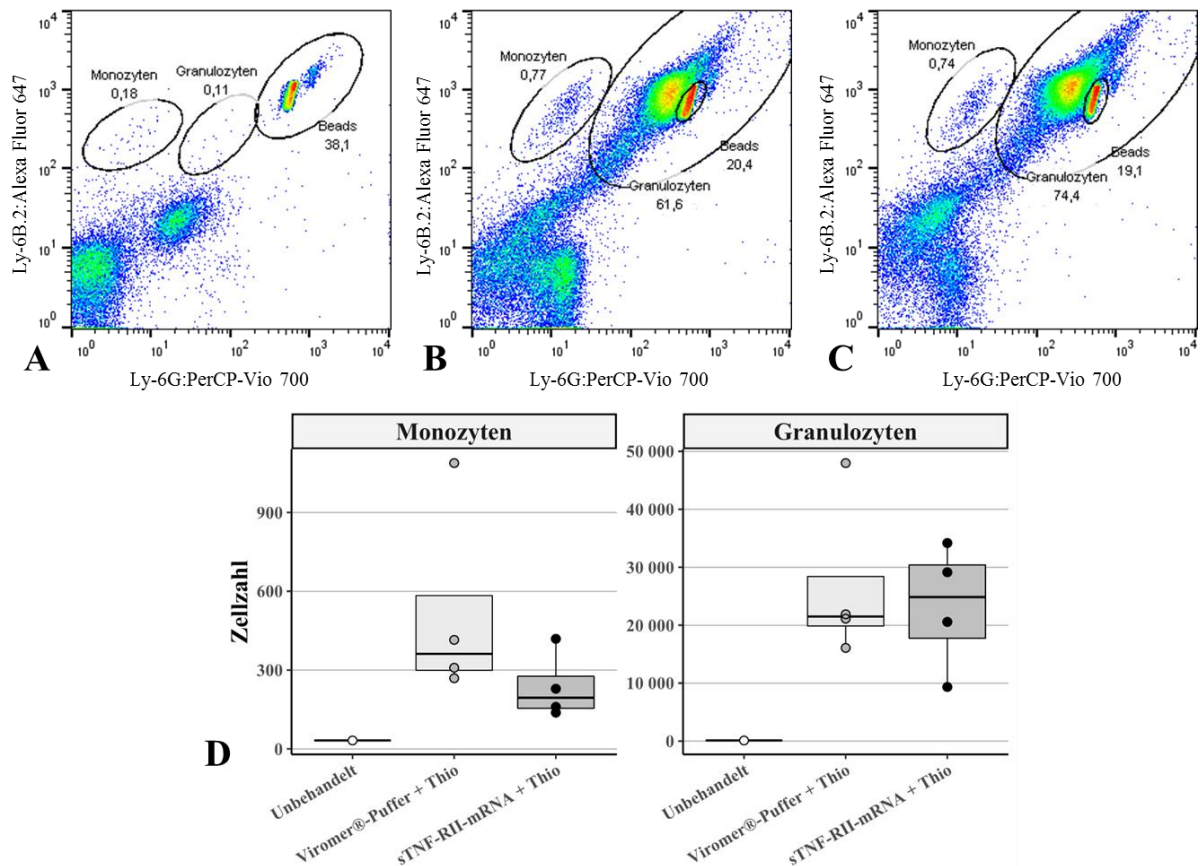


Abb. 40 Effektivität des Viromer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes: intravenöse Applikation

Darstellung der Ergebnisse der FACS-Analyse mittels *Dot Plot*. Die Bereiche der Monozyten, Granulozyten und *Beads* sind gekennzeichnet und der entsprechende prozentuale Anteil der jeweiligen Zellpopulation an der insgesamt gemessenen Zellzahl angegeben. A: Analyse der in *Peritoneallavageproben* enthaltenen Immunzellen nach i.v.-Applikation von Viromer-Puffer und ohne Auslösen einer Thioglykolat-induzierten Peritonitis.

B: Analyse der in der *Peritoneallavageflüssigkeit* enthaltenen Immunzellen nach i.v.-Applikation des Viromer-Puffers und Auslösen einer Thioglykolat-induzierten Peritonitis. C: Analyse der in der *Peritoneallavageflüssigkeit* enthaltenen Immunzellen nach i.v.-Applikation des Viromer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes und Auslösen einer Thioglykolat-induzierten Peritonitis. D: Quantifizierung der analysierten Zellen: Reduzierte Monozytenzahl in *Peritoneallavageproben* der Behandlungsgruppe (sTNF-RII-mRNA + Thio) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Viromer-Puffer + Thio). Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's *multiple comparison post-hoc*-Test; n = 4 (unbehandelt n = 1).

In Abb. 40 lässt sich erkennen, dass die Monozyteninfiltration in den *Peritoneallavageproben* der Behandlungsgruppe (Applikation des Viromer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes + Thio) im Vergleich zu *Peritoneallavageproben* der Kontrollgruppe (Applikation von Viromer-Puffer + Thio) reduziert ist. Die Infiltration von Granulozyten in das *Peritoneum* der Tiere aus der Behandlungsgruppe (Applikation des Viromer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes + Thio) war mit der Granulozyteninfiltration, die in den *Peritoneallavageproben* der Kontrollgruppe (Applikation des Viromer-Puffers + Thio) detektiert werden konnte, vergleichbar. Die Ergebnisse wurden mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunn's *multiple comparison post-hoc*-Test statistisch analysiert.

Ergebnisse

Eine repräsentative Auswahl der zu Abb. 40 gehörigen Ergebnisse der Zytokinbestimmung mittels Bio-Plex ist in Abb. 41 dargestellt.

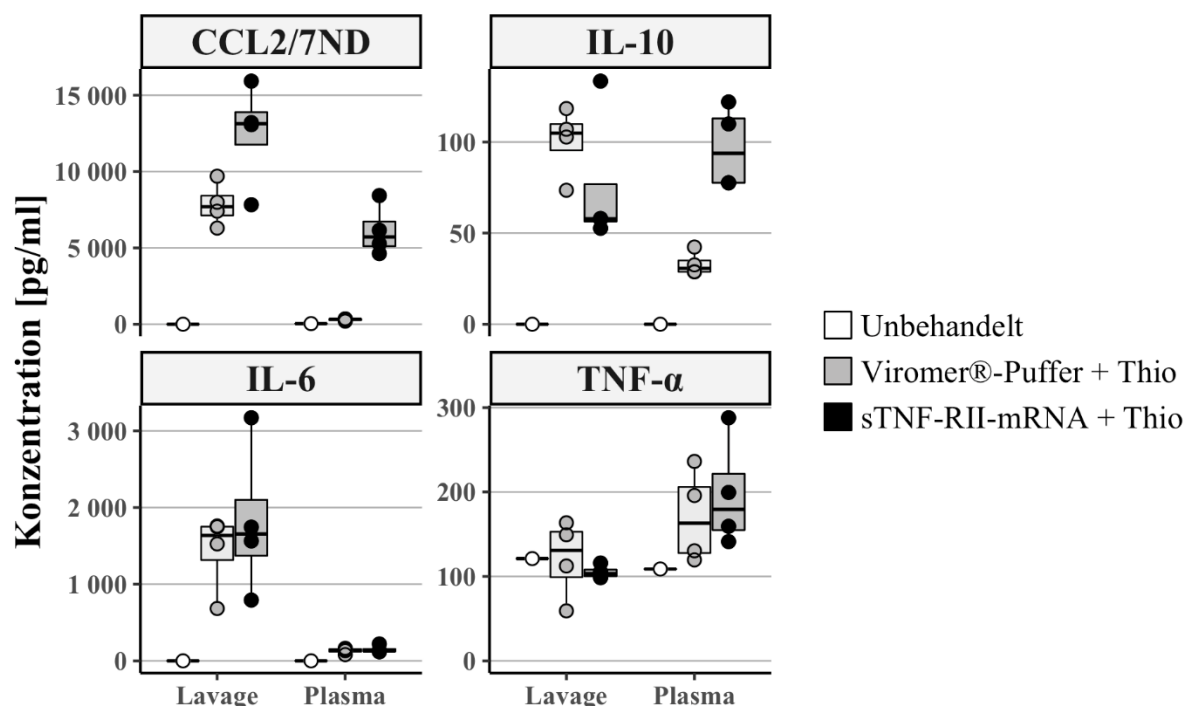


Abb. 41 Bio-Plex-Analyse des Überstandes der Peritoneallavageproben und Plasmaproben nach intravenöser Applikation des Viromer-sTNF-RII-Komplexes

Die Konzentration von 4 ausgewählten Zytokinen in Plasma- und Lavageproben ist dargestellt. CCL2/7ND: erhöhte CCL2/7ND-Konzentration in Lavageproben der Behandlungsgruppe und der Kontrollgruppe, erhöhte Konzentrationen im Plasma der Behandlungsgruppe. IL-10: erhöhte IL-10-Konzentration in Lavageproben und im Plasma der Kontrollgruppe und in der Behandlungsgruppe. IL-6: erhöhte IL-6-Konzentration in Lavageproben der Kontrollgruppe und der Behandlungsgruppe, vergleichbare Konzentration im Plasma aller Gruppen. TNF-α: reduzierte TNF-α-Konzentration in Lavageproben der Behandlungsgruppe, erhöhte TNF-α-Konzentration im Plasma der Kontrollgruppe und der Behandlungsgruppe. Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's *multiple comparison post-hoc*-Test; n = 4 (unbehandelt n = 1).

In den Proben der *Peritoneallavage* der Behandlungsgruppe kam es zu einem Anstieg von CCL2/7ND, IL-10 und IL-6 im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Die Konzentration von TNF-α in Lavageproben war in der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe und dem unbehandelten Tier dagegen reduziert.

Die CCL2/7ND-Konzentration war im Plasma der Behandlungsgruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe und dem unbehandelten Tier erhöht. Es kam außerdem zu einem Anstieg von IL-10 und TNF-α in der Behandlungsgruppe und der Kontrollgruppe im Vergleich zum unbehandelten Tier. Die Messwerte für IL-6 wiesen auf vergleichbare Konzentrationen zwischen Kontrollgruppe und Behandlungsgruppe hin. Mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunn's *multiple comparison post-hoc*-Test wurden diese Ergebnisse statistisch ausgewertet. Für die Ergebnisse der weniger stark veränderten Zytokine sei auf Tab. 56 und Tab. 57 im Anhang verwiesen.

Ergebnisse

In einem Reproduktionsversuch der ermittelten Ergebnisse wurde den Versuchstieren äquivalent der Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplex i.v. appliziert und die gewonnenen Lavage-Zellen mittels FACS analog analysiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 42 dargestellt.

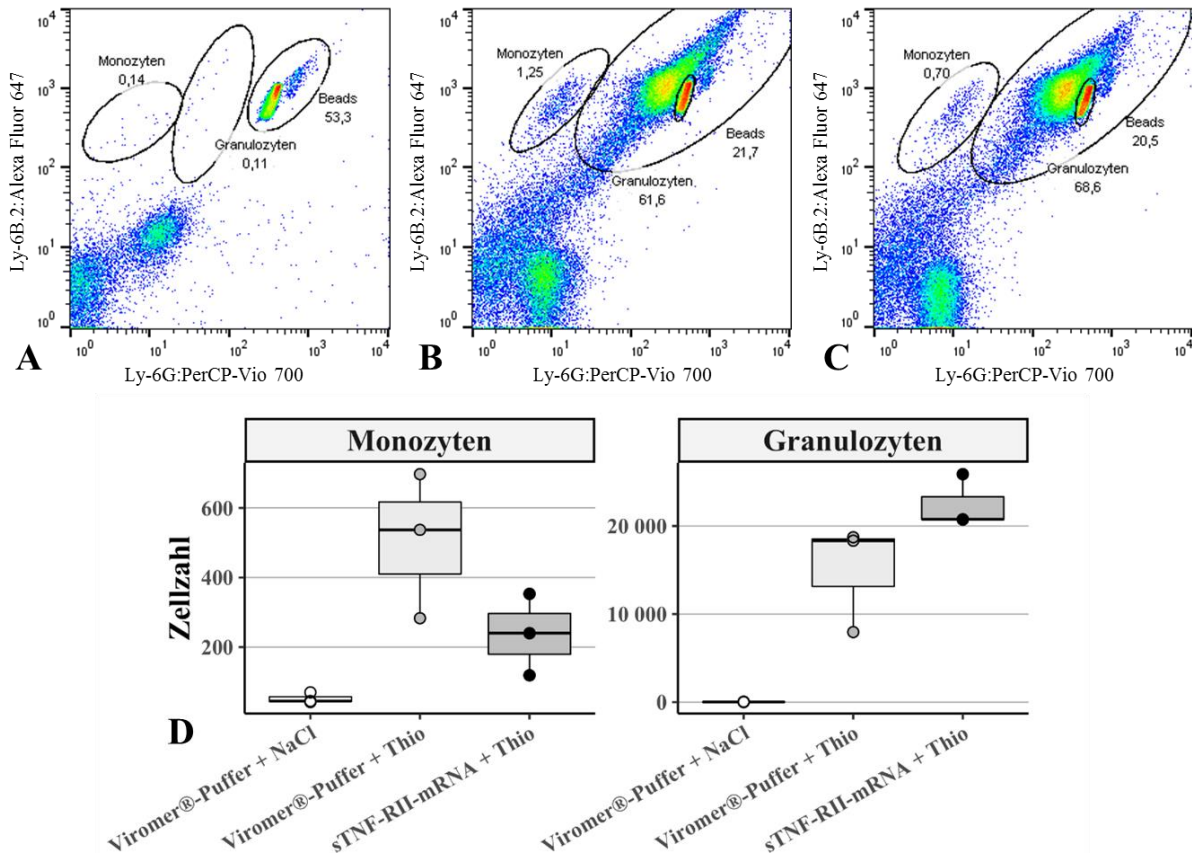


Abb. 42 Reproduzierbarkeit der i.v.-Applikation des Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes

Darstellung der Ergebnisse der FACS-Analyse mittels Dot Plot. Die Bereiche der Monozyten, Granulozyten und Beads sind gekennzeichnet und der entsprechende prozentuale Anteil der jeweiligen Zellpopulation an der insgesamt gemessenen Zellzahl angegeben. A: Analyse der in Peritoneallavageproben enthaltenen Immunzellen nach i.v.-Applikation des Viomer-Puffers ohne das Auslösen einer Thioglykolat-induzierten Peritonitis. B: Analyse der in der Peritoneallavageflüssigkeit enthaltenen Immunzellen nach i.v.-Applikation des Viomer-Puffers und Auslösen einer Thioglykolat-induzierten Peritonitis. C: Analyse der in der Peritoneallavageflüssigkeit enthaltenen Immunzellen nach i.v.-Applikation des Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes und Auslösen einer Thioglykolat-induzierten Peritonitis. D: Quantifizierung der analysierten Zellen: die Monozytenzahl in Peritoneallavageproben der Behandlungsgruppe (sTNF-RII-mRNA + Thio) war im Vergleich zur Kontrollgruppe (Vomer-Puffer + Thio) reduziert. Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's multiple comparison post-hoc-Test; n = 4.

Die erhöhte Infiltration von Monozyten und Granulozyten in das Peritoneum der Tiere aus der Kontrollgruppe (Applikation des Viomer-Puffers + Thio) gegenüber den Tieren der unbehandelten Gruppe konnte in den analysierten Peritoneallavageproben nachgewiesen und damit reproduziert werden. Auch die reduzierte Monozyteninfiltration in das Peritoneum der Tiere aus der Behandlungsgruppe (Applikation des Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes + Thio) konnte in den analysierten Peritoneallavagen im Vergleich zu den Peritoneallavagen der Kontrollgruppe (Applikation des Viomer-Puffers + Thio) nachgewiesen und gleichsam reproduziert werden. Die Zahl der infiltrierenden Granulozyten in Peritoneallavageproben der

Ergebnisse

Behandlungsgruppe (Applikation des Viromer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes + Thio) war im Vergleich zu analysierten Lavageproben der Kontrollgruppe (Applikation von Viromer-Puffer + Thio) erhöht. Die Ergebnisse wurden mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunn's *multiple comparison post-hoc*-Test statistisch ausgewertet.

Eine repräsentative Auswahl der Ergebnisse, der parallel durchgeführten Zytokinbestimmung ist in Abb. 43 dargestellt.

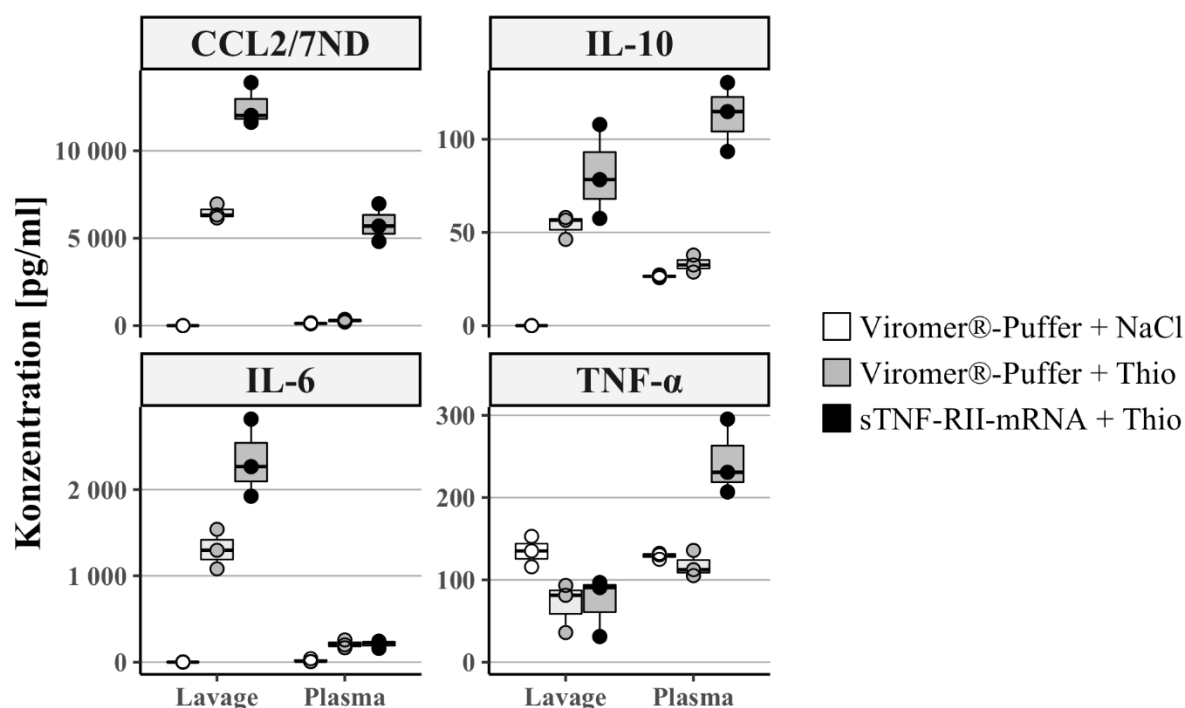


Abb. 43 Bio-Plex-Analyse des Überstandes der Peritoneallavageproben und Plasmaproben im Reproduktionsversuch der intravenösen Applikation des Viromer-sTNF-RII-Komplexes

Die Konzentrationen von 4 Zytokinen in Plasma- und Peritoneallavageproben mittels Bio-Plex-Analyse ist dargestellt. CCL2/7ND: erhöhte CCL2/7ND-Konzentration in Lavageproben der Behandlungsgruppe und der Kontrollgruppe, erhöhte Konzentration im Plasma der Behandlungsgruppe. IL-10: erhöhte IL-10-Konzentrationen in Lavageproben der Kontrollgruppe und der Behandlungsgruppe, erhöhte Konzentration im Plasma der Behandlungsgruppe. IL-6: erhöhte IL-6-Konzentration in Lavageproben und im Plasma der Kontrollgruppe sowie der Behandlungsgruppe. TNF-α: reduzierte Konzentration in Lavageproben der Kontrollgruppe und der Behandlungsgruppe, erhöhte TNF-α-Konzentration im Plasma der Behandlungsgruppe. Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's *multiple comparison post-hoc*-Test; n = 4.

Die Konzentrationen von CCL2/7ND, IL-10 und IL-6 stiegen in den Überständen der Peritoneallavageproben der Viromer-Komplex-behandelten Tiere und der Kontrollgruppe im Vergleich zum unbehandelten Tier an. Die Konzentration von TNF-α in Lavageproben der Behandlungs- und Kontrollgruppe war im Vergleich zum unbehandelten Tier reduziert.

Im Plasma kam es zu einem Anstieg von CCL2/7ND, IL-10 und TNF-α in der Behandlungsgruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe und dem unbehandelten Tier. Die Messwerte für IL-6 weisen auf vergleichbare Konzentrationen zwischen unbehandeltem Tier, Kontroll- und Behandlungsgruppe hin. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-

Wallis-Test und Dunn's *multiple comparison post-hoc*-Test. Für die Ergebnisse der weniger stark regulierten Zytokine sei auf die Tab. 58 und Tab. 59 im Anhang verwiesen.

4.6.2 Intraperitoneale Applikation des Viromer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes

Alternativ zu den durchgeführten i.v.-Applikationen, wurde den Versuchstieren der Viromer-TNF-RII-mRNA-Komplex i.p. appliziert und 6 Stunden später durch die Applikation einer 8 %igen Thioglykolat-Lösung eine Peritonitis ausgelöst (siehe 3.4.5.3). Nach 4 Stunden wurde eine *Peritoneallavage* durchgeführt und die so gewonnenen Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 44 dargestellt.

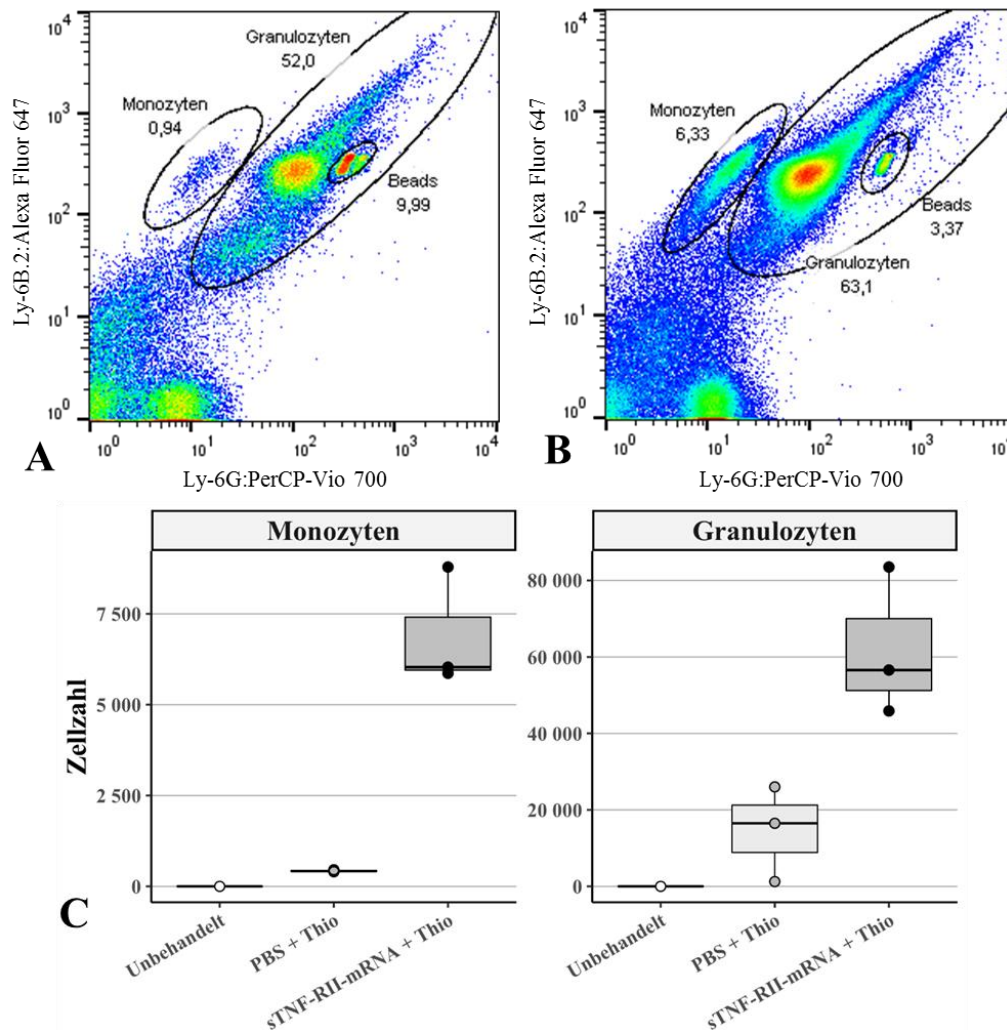


Abb. 44 Intraperitoneale Applikation des Viromer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes

Darstellung der Ergebnisse der FACS-Analyse mittels *Dot Plot*. Die Bereiche der Monozyten, Granulozyten und *Beads* sind gekennzeichnet und der entsprechende prozentuale Anteil der jeweiligen Zellpopulation an der insgesamt gemessenen Zellzahl angegeben. A: Analyse der in der *Peritoneallavage* enthaltenen Immunzellen nach Applikation von PBS und Auslösen einer Thioglykolat-induzierten Peritonitis. B: Analyse der in der *Peritoneallavageflüssigkeit* enthaltenen Immunzellen nach i.p.-Applikation des Viromer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes und Auslösen einer Thioglykolat-induzierten Peritonitis. C: Quantifizierung der analysierten Zellen: Erhöhung der Monozyten- und Granulozytenzahl in Lavageproben der Behandlungsgruppe (sTNF-RII-mRNA + Thio) im Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS + Thio) und der unbehandelten Gruppe. Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's *multiple comparison post-hoc*-Test; n = 3 (unbehandelt n = 1).

Ergebnisse

Die Monozyten- und Granulozytenzahl, als Maß für deren Infiltration, in den *Peritoneallavageproben* der Kontrollgruppe (Applikation von PBS + Thio) war im Vergleich zu den *Peritoneallavageproben* der unbehandelten Gruppe erhöht. Die Zahl der infiltrierenden Monozyten und Granulozyten, die in *Peritoneallavageproben* der Behandlungsgruppe (Applikation des Viromer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes + Thio) detektiert werden konnten, war im Vergleich zur Analyse der *Peritoneallavageflüssigkeit* der Kontrollgruppe (Applikation von PBS + Thio) erhöht. Die statistische Auswertung wurde mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunn's *multiple comparison post-hoc*-Test (Abb. 44) durchgeführt.

Eine repräsentative Auswahl der Ergebnisse von parallel durchgeführten Zytokinbestimmungen ist in Abb. 45 dargestellt.

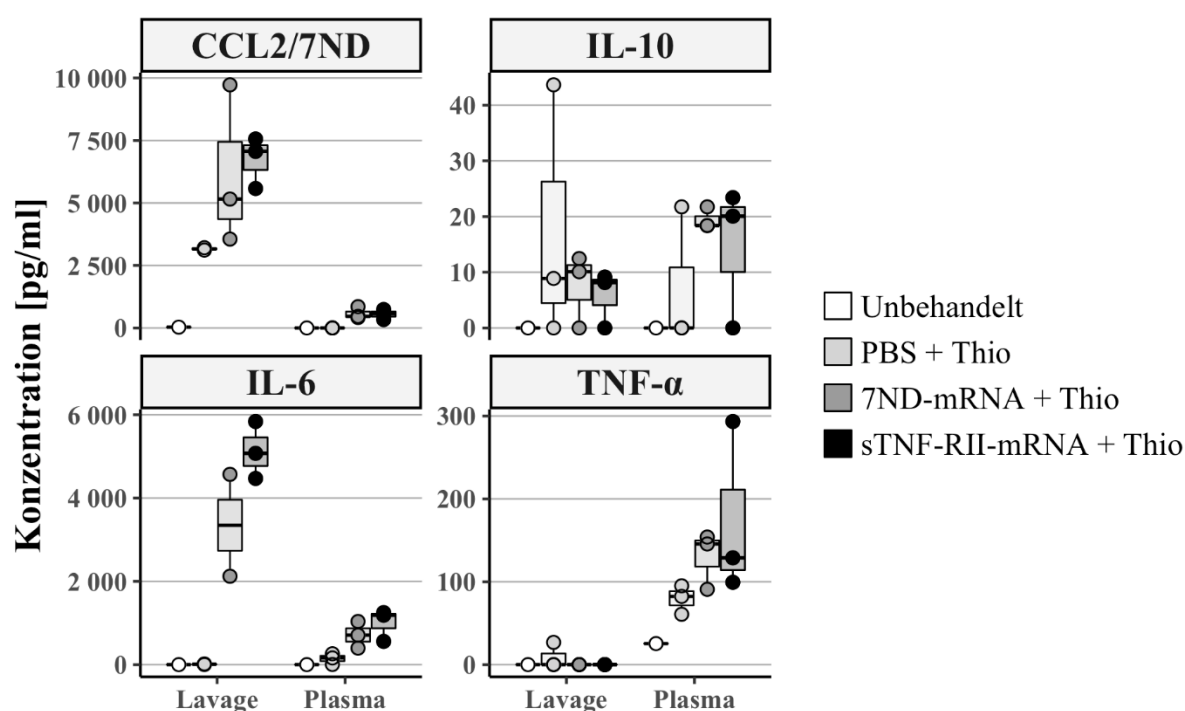


Abb. 45 Bio-Plex-Analyse des Überstandes der *Peritoneallavageproben* und *Plasmaproben* nach *intraperitonealer Applikation der Viromer-mRNA-Komplexe*

Die Konzentration von 4 Zytokinen in Plasma- und *Peritoneallavageproben* mittels Bio-Plex-Analyse ist dargestellt. CCL2/7ND: erhöhte CCL2/7ND-Konzentration in Lavageproben der Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe; erhöhte CCL2/7ND-Konzentration im Plasma der Behandlungsgruppen. IL-10: erhöhte IL-10-Konzentration in Lavageproben der Kontrollgruppe und in den Behandlungsgruppen; erhöhte IL-10-Konzentration im Plasma der Behandlungsgruppen. IL-6: erhöhte IL-6-Konzentration in Lavageproben und im Plasma beider Behandlungsgruppen. TNF-α: vergleichbare Konzentration in Lavageproben aller Gruppen, erhöhte TNF-α-Konzentration im Plasma der Kontrollgruppe und der Behandlungsgruppen. Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's *multiple comparison post-hoc*-Test; n = 3 (unbehandelt n = 1).

In den Proben der *Peritoneallavage* der Viromer-mRNA-Komplex-behandelten Tiere kam es zu einem Anstieg von CCL2/7ND und IL-10 im Vergleich zu der Kontrollgruppe und dem unbehandelten Tier. Die IL-6-Konzentration der *Peritoneallavageproben* war in der

Kontrollgruppe und dem unbehandelten Tier unverändert und stieg in den Proben der Behandlungsgruppen an. Die TNF- α -Konzentration in Lavageproben war in allen Gruppen vergleichbar.

In den Plasmaproben kam es in den Behandlungsgruppen zu einem Anstieg der CCL2/7ND-, IL-10- und IL-6-Konzentrationen im Vergleich zu der Kontrollgruppe und dem unbehandelten Tier. Die Konzentration von TNF- α hingegen war im Plasma der Kontrollgruppe und der Behandlungsgruppen im Vergleich zum unbehandelten Tier erhöht. Auch hier wurde die statistische Auswertung mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunn's *multiple comparison post-hoc*-Test durchgeführt.

Für die Ergebnisse der weniger stark regulierten Zytokine sei auf die Tab. 54, Tab. 55, Tab. 60 und Tab. 61 im Anhang verwiesen.

4.6.3 Vergleich *intraperitoneale* und *intravenöse* Applikation des Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes

Beim Vergleich der Abb. 40 und Abb. 44 ist zu erkennen, dass bei verschiedenen Applikationsrouten unterschiedliche Monozyten- bzw. Granulozytenzahlen in den *Peritoneallavageproben* der einzelnen Tiergruppen nachgewiesen werden konnten. Diese Ergebnisse sind in Abb. 46 charakteristisch zusammengefasst.

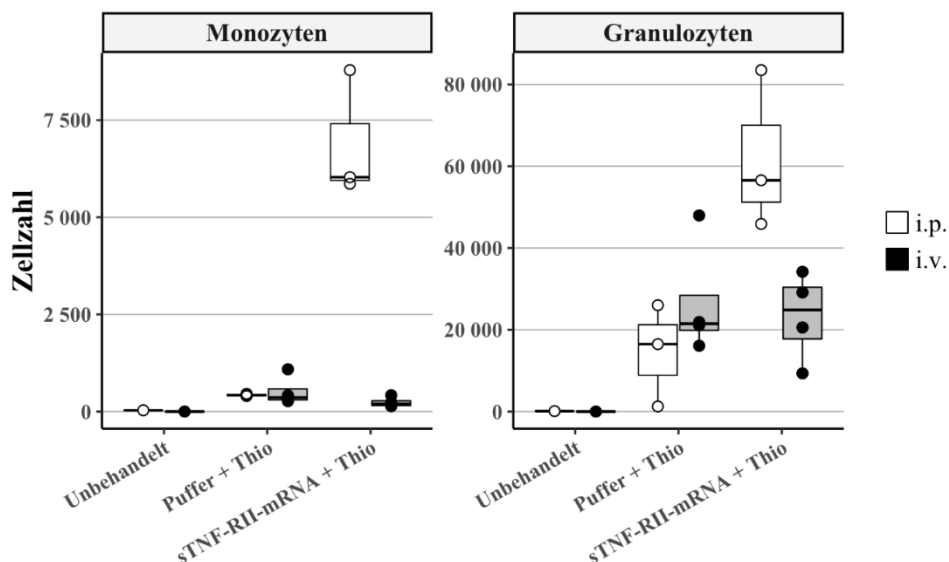


Abb. 46 Vergleich *intraperitoneale* und *intravenöse* Applikation des sTNF-RII-mRNA-Komplexes

Bestimmung mittels Durchflusszytometrie. Die Zahl der infiltrierenden Monozyten und Granulozyten war innerhalb der Kontrollgruppen vergleichbar. Die Monozytenzahl war nach der *intraperitonealen* Applikation des Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes im Vergleich zur i.v.-Applikation erhöht. Auch die Granulozytenzahl war nach i.p.-Applikation des Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes im Vergleich zur i.v.-Applikation erhöht. Mann-Whitney-Test; n = 3-4 (unbehandelt n = 1).

Die Unterschiede in den analysierten Zellzahlen weisen auf eine abweichende Größenordnung der Aktivierung der Monozyten- bzw. Granulozyteninfiltration hin. Beim Vergleich der Monozytenzahlen fiel auf, dass die Infiltration innerhalb der Kontrollgruppen vergleichbar war. Des Weiteren war die Monozytenzahl in den Behandlungsgruppen (sTNF-RII-mRNA + Thio) nach der i.p.-Applikation höher, als vergleichsweise nach einer i.v.-Applikation. Beim Vergleich der Granulozytenzahlen zeigte sich, dass die Infiltrationen innerhalb der Kontrollgruppen (PBS + Thio) vergleichbar waren. In den Behandlungsgruppen (sTNF-RII-mRNA + Thio) war die Granulozytenzahl nach der i.p.-Applikation im Vergleich zur i.v.-Applikation erhöht.

Der Vergleich der verschiedenen Applikationsrouten wurde mittels Mann-Whitney-Test statistisch ausgewertet. Auf Grund der geringen Stichprobengröße sollte das nicht signifikante Ergebnis dieser Tests kritisch betrachtet werden.

4.7 Zusammenfassender Versuch zur *intravenösen* Applikation des Viomer-7ND/sTNF-RII-mRNA-Komplexes

Abschließend wurde den Versuchstieren vergleichend entweder Viomer-7ND-mRNA-Komplex oder Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplex i.v. appliziert und 6 Stunden später durch die i.p.-Applikation einer 8 %igen Thioglykolat-Lösung eine Peritonitis ausgelöst (siehe 3.4.6). Nach 4 Stunden wurde eine *Peritoneallavage* durchgeführt und die so gewonnenen Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert, die Ergebnisse sind in Abb. 47 dargestellt.

Ergebnisse

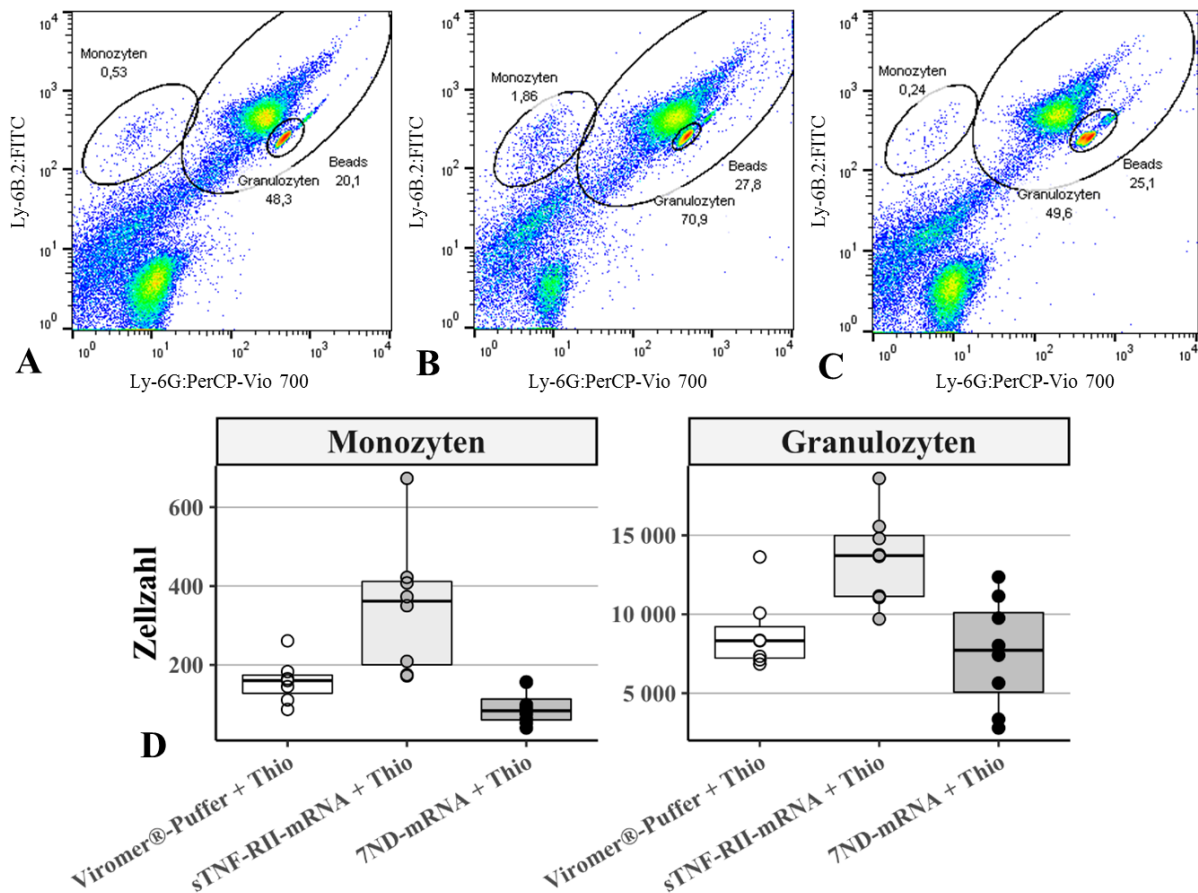


Abb. 47 Zusammenfassender Versuch zur i.v.-Applikation des Viomer-7ND- bzw. des sTNF-RII-mRNA-Komplexes

Darstellung der Ergebnisse der FACS-Analyse mittels *Dot Plot*. Die Bereiche der Monozyten, Granulozyten und *Beads* sind gekennzeichnet und der entsprechende prozentuale Anteil der jeweiligen Zellpopulation an der insgesamt gemessenen Zellzahl angegeben. A: Analyse der in *Peritoneallavageproben* enthaltenen Immunzellen nach *intravenöser* Applikation des Viomer-Puffers und Auslösen einer Thioglykolat-induzierten Peritonitis. B: Analyse der in *Peritoneallavageproben* enthaltenen Immunzellen nach i.v.-Applikation des Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes und Auslösen einer Thioglykolat-induzierten Peritonitis. C: Analyse der in *Peritoneallavageproben* enthaltenen Immunzellen nach i.v.-Applikation des Viomer-7ND-mRNA-Komplexes und Auslösen einer Thioglykolat-induzierten Peritonitis. D: Quantifizierung der analysierten Zellen: die Monozyten- und Granulozytenzahl in *Peritoneallavageproben* der sTNF-RII-mRNA-Behandlungsgruppe (sTNF-RII-mRNA + Thio) war im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Viomer-Puffer + Thio) erhöht; die Monozytenzahl war in der *Peritoneallavageflüssigkeit* der 7ND-mRNA-Behandlungsgruppe (7ND-mRNA + Thio) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Viomer-Puffer + Thio) reduziert. Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's *multiple comparison post-hoc*-Test; n = 7-8.

Aus Abb. 47 ist zu erkennen, dass eine erhöhte Infiltration von Monozyten und Granulozyten in das *Peritoneum* der Tiere aus der sTNF-RII-Behandlungsgruppe (Applikation des Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes + Thio) gegenüber den Tieren der Kontrollgruppe (Viomer-Puffer + Thio) in den analysierten *Peritoneallavageproben* nachgewiesen werden konnte. Des Weiteren konnte eine reduzierte Monozyteninfiltration in das *Peritoneum* der Tiere aus der 7ND-mRNA-Behandlungsgruppe (Applikation des Viomer-7ND-mRNA-Komplexes + Thio) in den analysierten Lavageproben im Vergleich zu den Lavageproben der Kontrollgruppe (Applikation des Viomer-Puffers + Thio) nachgewiesen werden. Die Granulozytenzahl in der

Ergebnisse

7ND-mRNA-Behandlungsgruppe (Applikation des Viomer-7ND-mRNA-Komplexes + Thio) war mit der Granulozytenzahl der Kontrollgruppe (Applikation des Viomer-Puffers + Thio) vergleichbar. Die Zahl der infiltrierten Granulozyten war in der Behandlungsgruppe (Applikation des Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes + Thio) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Applikation des Viomer-Puffers + Thio) hingegen erhöht.

Für die statistische Analyse wurde bei allen Ergebnissen der Effektivitätsversuche der Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem *Dunn's multiple comparison*-Test durchgeführt. Diese Tests ergaben keine signifikanten Unterschiede, was auf Grund der geringen Stichprobenzahl jedoch kritisch betrachtet werden sollte. In der Abb. 48 wurden alle Ergebnisse der durchgeführten Effektivitätsversuche zusammengefasst und mittels paarweisem Wilcoxon und anschließend Benjamini & Hochberg Post-Test auf das Vorhandensein signifikanter Unterschiede überprüft.

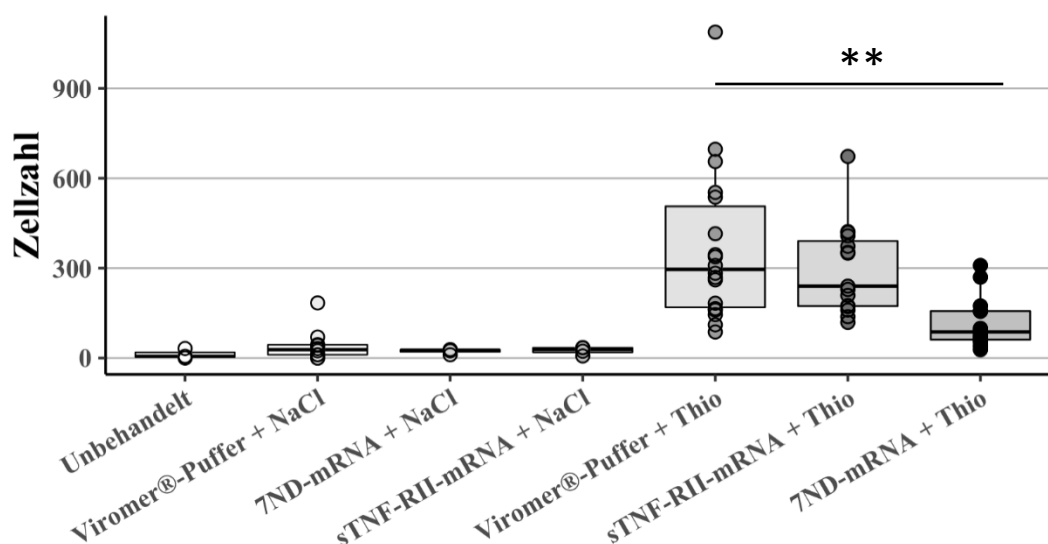


Abb. 48 Intravenöse Applikation des Viomer-Nukleinsäure-Komplexes: alle Monozyten-Zellzahlen zusammengefasst

Die in dieser Grafik gezeigten Daten sind die zusammengefassten Monozyten-Zellzahlen aller Versuche, in denen eine i.v.-Applikation des Viomer-Nukleinsäure-Komplexes erfolgte. ** $p = 0,0027$, paarweiser Wilcoxon, Benjamini & Hochberg post-Test, $n = 3-18$ (Unbehandelt $n = 1$).

Die Monozytenzahl war in der Behandlungsgruppe (7ND-mRNA + Thio) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Viomers®-Puffer + Thio) signifikant (** $p = 0,0027$) reduziert. Die Reduktion der Monozytenzahl war in der Behandlungsgruppe (sTNF-RII-mRNA + Thio) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Viomers®-Puffer + Thio) zwar reduziert, jedoch war dieser Unterschied nicht statistisch signifikant.

Für die Applikation des Viomer-Nukleinsäure-Komplex ist eine repräsentative Auswahl der (Egger 2005) Ergebnisse der parallel durchgeführten Zytokinbestimmung in Abb. 49 dargestellt.

Ergebnisse

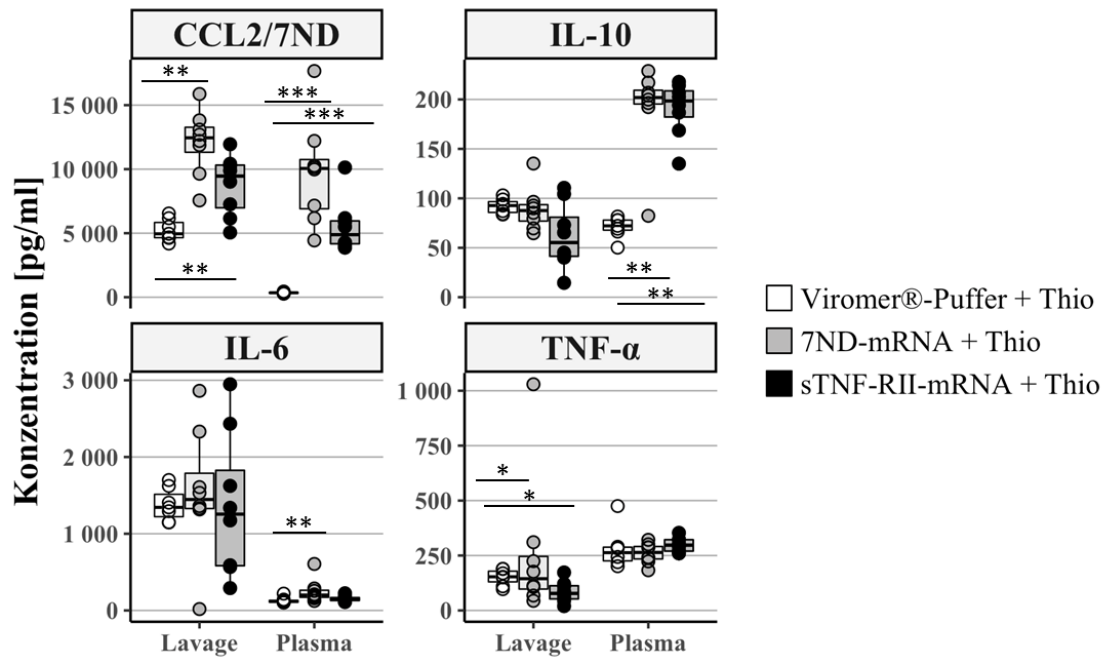


Abb. 49 Bio-Plex-Analyse des Überstandes der *Peritoneallavageproben* und *Plasmaproben* im zusammenfassenden Versuch nach *intravenöser* Applikation des *Viromer-7ND-mRNA-Komplexes*

Die Konzentration von 4 Zytokinen in Plasma- und *Peritoneallavageproben* mittels Bio-Plex-Analyse ist dargestellt. CCL2/7ND: erhöhte CCL2/7ND-Konzentration in Lavageproben und dem Plasma der beiden mRNA-Behandlungsgruppen (** p = 0,0059, *** p = 0,0003). IL-10: reduzierte IL-10-Konzentration in Lavageproben der beiden mRNA-Behandlungsgruppen, erhöhte Konzentration im Plasma der beiden mRNA-Behandlungsgruppen (** p = 0,0014). IL-6: vergleichbare Konzentrationen in Lavageproben aller Gruppen, erhöhte IL-6-Konzentration in der Kontrollgruppe im Vergleich zum unbehandelten Tier und der Behandlungsgruppe (** p = 0,0093). TNF-α: reduzierte TNF-α-Konzentration in Lavageproben der beiden mRNA-Behandlungsgruppen (* p = 0,0028), vergleichbare Konzentration im Plasma aller Gruppen. Mann-Whitney-Test; n = 7-8.

Wie in Abb. 49 zu erkennen, kam es in den Proben der *Peritoneallavage* der Viromer-Nukleinsäure-Komplex-behandelten Tiere zu einem Anstieg von CCL2/7ND im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Die Konzentration von IL-10 und TNF-α war in den Lavageproben der beiden mRNA-Behandlungsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe reduziert. Die IL-6-Konzentration in der Lavageflüssigkeit war in allen Gruppen vergleichbar.

Im Plasma der mRNA-Behandlungsgruppen kam es zu einem Anstieg von CCL2/7ND und IL-10 im Vergleich zur Kontrollgruppe. Wohingegen die Messwerte für IL-6 und TNF-α auf vergleichbare Konzentrationen im Plasma der Kontrollgruppe und den mRNA-Behandlungsgruppen hinweisen. Die Ergebnisse der am stärksten regulierten Zytokine wurden mittels Mann-Whitney-Test statistisch analysiert. Die sich daraus ergebenden statistisch signifikanten Unterschiede sind in Abb. 49 dargestellt. Für die Ergebnisse der weniger stark veränderten Zytokine sei auf die Tab. 62 und Tab. 63 im Anhang verwiesen.

5 Diskussion

Das primäre Ziel der vorliegenden Dissertation war es, den Einfluss zweier ausgewählter Viromer-Nukleinsäure-Komplexe auf die Infiltration von Monozyten in ein entzündetes Gewebe zu untersuchen. Die erste ausgewählte mRNA codiert für 7ND, welches ein gentechnisch modifiziertes CCL2-Molekül ist, dem die Aminosäuren 2-8 fehlen und das natives CCL2 binden kann. Da der CCR2 nur von einem N-terminal intaktem CCL2 aktiviert werden kann, wirkt 7ND als CCL2-Antagonist (Zhang und Rollins 1995). Die zweite mRNA codiert für die lösliche Ligandenbindungsdomäne des TNF-RII (sTNF-RII), welche natives TNF- α bindet. Wenn TNF- α an diese Domäne gebunden ist, kann es keinen TNF-Rezeptor mehr aktivieren, dadurch wirkt sTNF-RII als TNF- α -Antagonist (Zhang und Rollins 1995; Hassett et al. 2018). Im Modell der Thioglykolat-induzierten Peritonitis sollte die Wirksamkeit der ausgewählten Viromer-Nukleinsäure-Komplexe auf CCL2 und TNF- α und dem zu Folge auf die Infiltration von Monozyten in das entzündete Gewebe analysiert werden.

Folgende Beobachtungen konnten bezüglich der konkreten Ziele dieser Dissertation erstellt werden:

- Es konnte sowohl für den Viromer-7ND-mRNA-Komplex, als auch für den Viromer-sTNF-RII-mRNA-Komplex die Expression der entsprechenden mRNA in der Zellkultur und somit eine erfolgreiche Transfektion der RAW 246.7-Zellen nachgewiesen werden.
- Bei der Analyse der Biodistribution der applizierten FLuc-mRNA konnte eine deutlich erhöhte Luciferase-Expression vor allem in der Milz festgestellt werden.
- Bei der Analyse der Quantifizierung der applizierten 7ND-mRNA konnte eine deutliche erhöhte 7ND-mRNA-Konzentration im Knochenmark festgestellt werden.
- Durch die Applikation von Thioglykolat konnte eine Peritonitis ausgelöst und die gesteigerte Infiltration von Monozyten nachgewiesen werden.
- Nach der Applikation eines Viromer-7ND-mRNA-Komplexes konnte eine reduzierte Infiltration von Monozyten nachgewiesen werden.
- Nach der Applikation eines Viromer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes konnte ein Trend zur reduzierten Infiltration der Monozyten nachgewiesen werden.

5.1 Vergleich der Viromere mit den in der Literatur beschriebenen nicht-viralen Transfektions-Vehikel für den Nukleinsäure-Transport *in vivo*

Wie unter 2.4.1 beschrieben, müssen die ausgewählten Nukleinsäuren in ein geeignetes Trägermaterial verpackt werden, um diverse Barrieren zu überwinden und vor Nukleasen geschützt zu sein. Diese Trägermaterialien müssen des Weiteren dafür sorgen, dass die Nukleinsäuren innerhalb der Kapillaren nicht vom mononukleären Phagozyten-System erkannt werden, von den Blutgefäßen in das Gewebe gelangen und im Anschluss an die Zielzelle binden. Um in eine Zelle aufgenommen zu werden, müssen die Vehikel zunächst die Zytoplasmamembran und nach erfolgter Endozytose die Endosomenmembran überwinden. Bei der Transfektion mit einer RNA, genügt es, wenn diese bis in das Zytosol gelangt, da die Translation einer RNA immer im Zytosol stattfindet. Soll jedoch mit einer DNA transfiziert werden, muss diese noch durch die Kernmembran gelangen, um im Zellkern transkribiert werden zu können. Im Vergleich zu viralen Vektoren können nicht-virale Trägermaterialien einfach und in großen Mengen produziert, sowie leicht angewendet werden. Allerdings haben nicht-virale Vehikel eine geringere Effizienz im Vergleich zu den viralen Vektoren und weitere diverse Nachteile, auf die im folgenden Vergleich verschiedener nicht-viraler Trägermaterialien näher eingegangen werden soll (Nishikawa und Huang 2001). Eine Genexpression kann schon durch eine direkte Applikation einer Nukleinsäure in Form eines Plasmids im Skelettmuskel ausgelöst werden (Wolff et al. 1990). Jedoch ist diese Expression relativ ineffizient und beschränkt sich auf das umliegende Gewebe der Injektionsstelle (Wolff et al. 1991). Nach einer i.v.-Applikation des reinen Plasmids, wird die Nukleinsäure von Nukleasen und dem mononukleären Phagozyten-System abgebaut, bevor sie die Zielzelle erreichen kann (Kawabata et al. 1995). Durch sogenanntes *Gene-Gun* kann das gewünschte Plasmid direkt in Leber, Haut oder Muskel appliziert werden. Das Plasmid wird dafür an Goldpartikel gebunden und in die Patrone der Genkanone geladen. Beim Auslösen der Kanone, wird ein Gasstrahl (zum Beispiel Helium) an der Patrone vorbeigeführt, wobei die Partikel freigesetzt und beschleunigt werden. So gelangen die Nukleinsäure-beschichteten Goldpartikel mit einer hohen Geschwindigkeit direkt durch die Zellmembran in das Zytoplasma oder direkt in den Nukleus und umgehen somit den enzymatischen Abbau (Prazeres und Monteiro 2014). Allerdings kann dieses Verfahren nur an frei präparierten Organen angewendet werden, da die Eindringtiefe der Goldpartikel maximal 0,5 mm beträgt. Des Weiteren führt die *in-vivo* Anwendung der *Gene-Gun* nur zu einer kurzfristigen und geringen Expression des Genprodukts (Yang et al. 1990). Beim Verfahren der Elektroporation werden nach der Applikation einer

Nukleinsäure in Form eines Plasmids, durch das Anlegen von elektrischen Impulsen Poren in der Zellmembran geöffnet, durch welche die Nukleinsäure in die Zelle gelangen kann. Kurz darauf schließen sich die Poren wieder und die Nukleinsäure verbleibt in der Zelle. Diese Membranöffnungen sind, solange die Stärke der elektrischen Impulse angemessen ist, reversibel und die Zellen bleiben lebensfähig (Mir et al. 1988). Die Elektroporation wurde bereits erfolgreich bei der Transfektion von Leber, Melanomen, Skelettmuskulatur und der Haut durchgeführt (Johnson et al. 1998). Auf Grund der neu geschaffenen Permeabilität der Zellmembran, können jedoch auch externe Bestandteile in die Zelle diffundieren und die zelluläre Zusammensetzung verändern. Diese Toxizität kann verringert werden, wenn die Dauer und das Ausmaß der Elektroporation und damit auch der Permeabilität minimiert werden (Bigey et al. 2002). Jedoch kann die Elektroporation weitere unerwünschte Nebenwirkungen, wie eine Entzündung, Verbrennungen, Hautirritationen und die Bildung von freien Radikalen induzieren (Bonnafeux et al. 1999). Kationische Lipide sind in der Lage, Nukleinsäuren zu binden und diese durch Endozytose in die Zelle zu transportieren. Jedoch kommt es nur bei einem geringen Anteil der Lipoplexe zur Freisetzung der Nukleinsäuren in das Zytosol. Der Großteil der Lipoplexe verbleibt in den Endosomen und wird abgebaut. Durch die Zugabe eines *Diioleoylphosphatdylethanolamin* (DOPE) kann die Stabilität des Lipoplex in einer Lipiddoppelschicht verbessert werden, wodurch die Zellmembran instabil wird und die Nukleinsäure aus dem Lipoplex freigesetzt wird (Farhood et al. 1995). Jedoch wird nur ein Bruchteil von diesen freigesetzten Nukleinsäuren vom Zytoplasma in den Zellkern transportiert. Der Großteil gelangt wieder in Endosomen, wobei diese Endosomen am Zellkern verschmelzen und anschließend große membrangebundene Aggregate bilden (Zabner et al. 1995). Das heißt, dass trotz gesteigerter Freisetzung aus den Endosomen nur ein geringer Anteil einer applizierten DNA den Zellkern erreicht und exprimiert werden kann. Um eine effiziente *in vivo* Transfektion zu erreichen, müsste demnach eine sehr große Menge an Lipoplexen appliziert werden. Jedoch hat eine erhöhte Konzentration an Lipiden auch eine höhere Toxizität. In einer Studie aus dem Jahr 2000 konnte nach der i.v.-Applikation eines hochdosierten Lipoplexes beobachtet werden, dass es zu signifikanten hämatologischen und serologischen Veränderungen, wie Leukopenie und Thrombozytopenie kam. Zusätzlich wurde durch die Applikation eine inflammatorische Reaktion ausgelöst, wobei es zur Komplementaktivierung und gesteigerten Synthese von TNF- α , IL-6 und IL-12 kam (Tousignant et al. 2000). In einer Studie aus dem Jahr 1996 konnte nachgewiesen werden, dass die i.v.-Applikation eines hochdosierten Lipoplex eine Lungenembolie verursachen kann (Litzinger et al. 1996). Bei der systemischen Applikation eines Lipoplex ist meistens eine noch höhere Konzentration der

kationischen Lipide nötig, um eine optimale Transfektion zu erreichen (Felgner et al. 1993). Die Effizienz der Lipofektion sinkt nach der Zugabe von Serum drastisch, da die kationischen Lipide durch die Adsorption negativ geladener Proteine aus dem Blut inaktiviert werden (Felgner et al. 1987). Kationische Polymere wie zum Beispiel Polyethylenimin (PEI) neigen auf Grund ihrer positiv geladenen Komplexe nach Kontakt mit Serumbestandteilen zur Aggregatbildung (Kircheis et al. 1999). Diese Aggregate können mit dem Blutfluss in die Lunge gelangen, wo sie kleine Kapillaren verstopfen und eine Embolie auslösen können (Ogris et al. 1999). In einer Studie von 2002 wurde nach der i.v.-Applikation eines PEI-Komplexes eine erhöhte Toxizität der Komplexe nachgewiesen. Bei einer niedrigen Komplexkonzentration (50 µg) war der Gentransfer ineffizient und bei einer mittleren Konzentration (100 µg) traten vermehrt Lebernekrosen auf. Bei der höchsten Konzentration (150 µg) starben alle Versuchstiere innerhalb von 30 Minuten nach der Injektion (Chollet et al. 2002). Daraus kann geschlussfolgert werden, dass auf Grund der neuen Behandlungsmöglichkeiten mittels Gentherapie geeignetere Trägermaterialien benötigt werden. In bisher unveröffentlichten Studien der Lipocalyx GmbH wurden verschiedene Analysen zur Toxizität der Viromere durchgeführt. Dabei wurden keine klinischen Anzeichen einer Toxizität festgestellt (persönliche Kommunikation mit Dr. Christian Reinsch, Lipocalyx GmbH). Nach der Applikation beider Viromer-Nukleinsäure-Komplexe konnte eine leicht erhöhte Plasma-AST-Aktivität und bei der Applikation des Viromer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes zusätzlich eine stark erhöhte Plasma-LDH-Aktivität festgestellt werden (siehe 4.4). Jedoch waren die Tiere nach der i.v.-Applikation des Viromer-Nukleinsäure-Komplexes klinisch unauffällig und auch eine Adspektion der inneren Organe nach dem versuchsbedingten Töten der Tiere blieb ohne Befund. Da keine histologischen Untersuchungen an den entnommenen Organen durchgeführt wurden, sind Veränderungen allerdings nicht gänzlich auszuschließen. Anhand der Ergebnisse der Machbarkeitsstudie in der Zellkultur konnte eine erfolgreiche Transfektion mit den Viromer-Nukleinsäure-Komplexen *in vitro* nachgewiesen werden (siehe 4.1). In einer Studie von 2015 wiesen Viromer-transfizierte Zellen ein 2- bis 10-fach höheres Expressionsniveau von Luciferase auf, als die mit Lipofectamin 3000 transfizierten Zellen (Rao et al. 2015). Nach der i.v.-Applikation des Viromer-7ND-mRNA-Komplexes konnte eine signifikante Reduktion der infiltrierenden Monozytenzahl gemessen werden, was auf eine erfolgreiche Transfektion schließen lässt (siehe Abb. 48). Somit stellen die Viromere eine vielversprechende Alternative zu den herkömmlichen nicht-viralen Trägermaterialien dar.

5.2 Ist das Modell der Thioglykolat-induzierten Peritonitis ein geeignetes Tiermodell für die Testung von Viromeren?

Thioglykolat ist ein häufig eingesetztes Stimulanz, um eine nicht-infektiöse Peritonitis auszulösen und die ins *Peritoneum* infiltrierenden Monozyten zu erforschen (Li et al. 1997). CCL2 spielt nach der i.p.-Applikation von Thioglykolat eine entscheidende Rolle bei der Rekrutierung der Monozyten in das *Peritoneum*. In einer Studie von 1998 konnte gezeigt werden, dass Mäuse, denen das Gen für CCL2 fehlte, nach der Applikation von Thioglykolat keine Monozyten in das *Peritoneum* rekrutieren konnten (Lu et al. 1998). Anhand der Ergebnisse aus den oben genannten Versuchen, ist zu erkennen, dass die Zahl infiltrierender Monozyten nach der Applikation einer 7ND-mRNA signifikant reduziert ist, was die entscheidende Rolle von CCL2 während einer Thioglykolat-induzierten Peritonitis bestätigt (siehe Abb. 48). Da CCL2 in diesem Tiermodell Auslöser der Monozyten-Rekrutierung ist, eignet sich das Modell zur Testung des Viromer-7ND-mRNA-Komplexes. Es konnte nachgewiesen werden, dass die TNF- α -Konzentration während einer Thioglykolat-induzierten Peritonitis sowohl im Plasma, als auch in der Lavageflüssigkeit erhöht ist (Lam et al. 2013). Allerdings fehlen Literaturangaben darüber, inwiefern TNF- α in diesem Modell an der Rekrutierung der Monozyten beteiligt ist. In den oben gezeigten Ergebnissen konnte zwar eine Reduktion der Monozytenzahl festgestellt werden, jedoch war diese im Vergleich zu der Reduktion der Monozytenzahl nach der Applikation des Viromer-7ND-mRNA-Komplexes nicht signifikant. Daraus lässt sich schließen, dass TNF- α keine Schlüsselfunktion in der Monozytenrekrutierung während der durch Thioglykolat ausgelösten Peritonitis hat. Es konnte gezeigt werden, dass TNF- α bei einer rheumatoiden Arthritis ausschlaggebend für die Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen und somit in den Migrationsprozess von Monozyten involviert ist (Moreland et al. 1997). Auf Grund dessen wird die erneute Testung des Viromer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes in dem möglicherweise geeigneteren Modell der Kollagen-II-induzierten rheumatoiden Arthritis empfohlen.

In Abb. 50 sind die Monozytenzahlen aus allen Effektivitäts-Versuchen vergleichend dargestellt. Dabei ist zu erkennen, dass die Zahl der infiltrierenden Monozyten durch die Applikation von Thioglykolat nicht konstant gesteigert ist. Auf Grund dieser schwankenden Monozytenzahl wird ein Vergleich zwischen den einzelnen Versuchen und damit der Wirksamkeit der eingesetzten Viromer-Nukleinsäure-Komplexe erschwert.

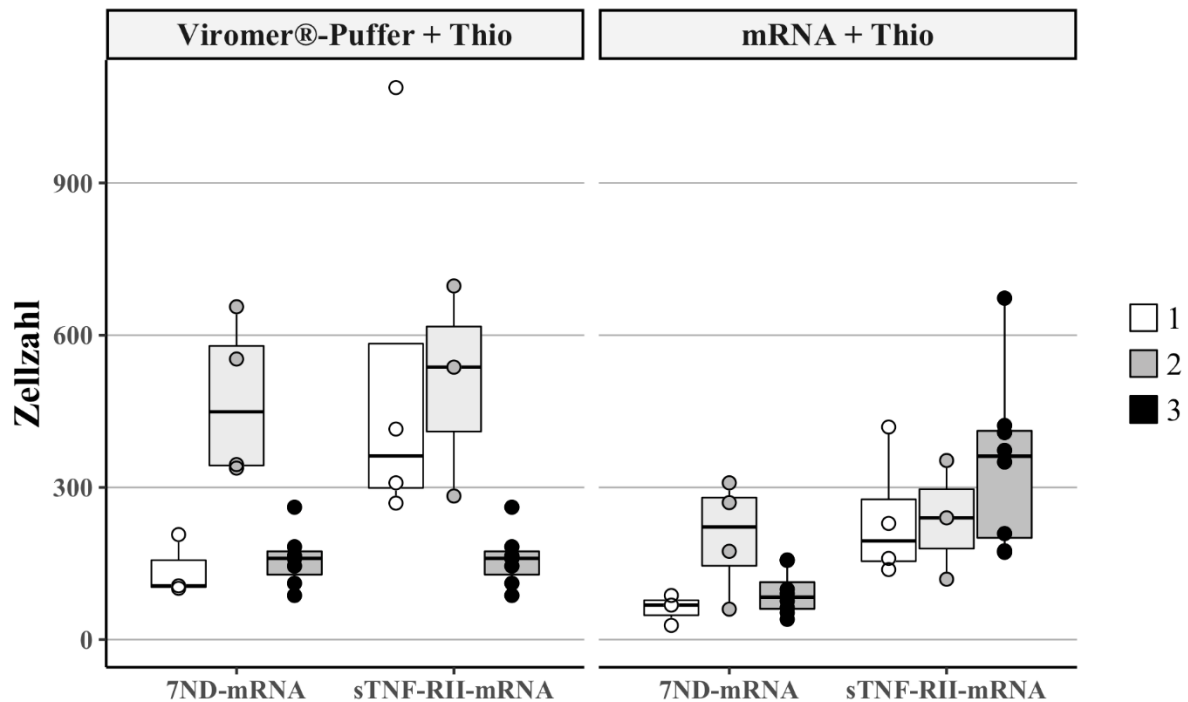


Abb. 50 Vergleich der Monozytenzahlen

In dieser Abbildung sind die Monozytenzahlen aus den Effektivitätsversuchen der i.v.-Applikation dargestellt. Die einzelnen Graphen stellen dabei die jeweiligen Versuche dar: 1 = i.v.-Applikation, 2 = Reproduzierbarkeit der i.v.-Applikation, 3 = zusammenfassender Versuch der i.v.-Applikation. Dabei fällt auf, dass die Zahl der infiltrierenden Monozyten durch die Applikation von Thioglykolat nicht konstant erhöht ist. n = 3-8.

Thioglykolat besteht unter anderem aus Proteinen und reduzierten Kohlenhydraten und muss während der Herstellung inkubiert werden, um in Lösung zu gehen. Es wird vermutet, dass durch diese lange Inkubation eine nicht-enzymatische Glykierung ausgelöst wird. Dabei handelt es sich um den Prozess der Maillard-Reaktion, in dem als Zwischenschritt eine Schiffssche Base gebildet wird. Dabei entstehen sogenannte *Advanced Glycation Endproducts* (AGE), welche eine unterstützende Rolle bei der Stimulation von Makrophagen spielen (Li et al. 1997). Da diese Reaktion nicht konstant beeinflusst werden kann, besteht die Vermutung, dass die unterschiedliche Konzentration der AGE zu einer unregelmäßigen Monozytenrekrutierung führt.

Auf Grund dessen sollten weiterführende Versuche in stabileren und eventuell auch TNF- α -abhängigen Tiermodellen durchgeführt werden.

5.3 Sind Viomere ein geeignetes Trägersystem für den gentherapeutischen mRNA-Transfer?

Reine Plasmide ohne Verpackung in einem Trägermaterial werden nach der i.v.-Applikation sehr schnell von Nukleasen im Blut abgebaut (Kawabata et al. 1995). Um diesen Abbau zu umgehen, wurde die in Plasmiden verpackte 7ND-cDNA in diversen Studien in Liposomen verpackt oder nach einer *intramuskulären* Injektion mittels Elektroporation in die Zelle transportiert (Mori et al. 2002; Ni et al. 2001). Da Plasmide aus Bakterien stammen, ist ihre Herstellung in Bezug auf die Qualitätskontrolle sehr aufwendig, weil jegliche Kontamination ausgeschlossen werden muss (Schmeer et al. 2017). Die synthetisch hergestellten Viomere stellen daher eine Alternative zu den Plasmiden dar. Da Viomere vorrangig Zellen mit hoher Phagozytose-Aktivität transfizieren, wurde für den *Proof-of-Concept*-Versuch eine Maus-Makrophagen-Zelllinie gewählt. Nach der Transfektion von RAW-Zellen mit einem Viomer-7ND-mRNA-Komplex bzw. einem Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplex konnten erhöhte 7ND- und sTNF-RII-Konzentrationen im Zellüberstand gemessen werden (siehe 4.1). Diese mit der Zeit ansteigenden Konzentrationen lassen auf eine erhöhte 7ND- bzw. sTNF-RII-Expression schließen. Bei der Analyse der Biodistribution einer FLuc-mRNA konnte eine deutlich erhöhte Biolumineszenz in der Milz festgestellt werden (siehe 4.3). Makrophagen liegen unter physiologischen Umständen ruhend im Gewebe, bis sie durch im Blut zirkulierende Monozyten aktiviert bzw. in aktivierter Form rekrutiert werden. Da die Milz allerdings unter anderem der Blutreinigung dient, gelangt der i.v. applizierte Viomer-FLuc-mRNA-Komplex mit dem Blutstrom zu den dort ruhenden Makrophagen. Weil die Milz auch für die Bildung, Reifung und Speicherung der Leukozyten verantwortlich ist, befindet sich in diesem Organ eine hohe Anzahl an Makrophagen, die nach erfolgreicher Transfektion die Luciferase bilden und so zu einer hohen Biolumineszenz der Milzzellen führen. Nach der i.v.-Applikation des Viomer-7ND-/sTNF-RII-mRNA-Komplexes und dem Auslösen einer Thioglykolat-induzierten Peritonitis konnte eine Reduktion der in das *Peritoneum* infiltrierenden Monozyten festgestellt werden (siehe 4.5.1 und 4.6.1). Dieses Ergebnis konnte in einem anschließenden Versuch auch reproduziert werden (siehe 4.5.2 und 4.6.2). Um sicher zu gehen, dass es sich dabei nicht um einen vom Viomer-stammenden Effekt handelt, wurde in einem weiteren Versuch eine nonsense-mRNA (FLuc-mRNA) i.v. appliziert. Da in diesem Versuch die Reduktion der Monozytenzahl geringer als im vorherigen Versuch war, ist von einem spezifischen Behandlungseffekt der 7ND-mRNA bzw. der sTNF-RII-mRNA auszugehen (siehe 4.5.3 und 4.6.1). Nach der i.p.-Applikation des Viomer-7ND- bzw. sTNF-RII-mRNA-

Komplexes kam es nicht zu einer Reduktion der infiltrierenden Monozytenzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies lässt darauf schließen, dass weder 7ND an das im Blut zirkulierende CCL2 noch sTNF-RII an das im Blut zirkulierende TNF- α bindet, wodurch die Chemotaxis der Monozyten nicht gehemmt werden kann. Die Anzahl der Monozyten war aus einem bisher unbekannten Grund sogar deutlich höher als in der Kontrollgruppe. Vermutlich stimulieren die i.p. applizierten Viomer-Partikel eine entzündungsfördernde Wirkung, weshalb eine i.p.-Applikation der Viomer-Nukleinsäure-Komplexe kontraindiziert ist.

TNF- α spielt in diversen entzündlichen Erkrankungen eine entscheidende Rolle, weshalb es bereits verschiedene Medikamente gibt, die antagonistisch auf TNF- α wirken. Infliximab und Adalimumab bestehen aus Antikörpern, die an TNF- α binden und somit eine neutralisierende Wirkung bezüglich der Wirkung von TNF- α aufweisen. Da TNF- α aber auch eine entscheidende Rolle in der Immunabwehr spielt, kann es durch dessen vollständige Blockierung zu starken Nebenwirkungen, wie Immunsuppression und gesteigerter Tumorgenese kommen. Solche Antikörper besitzen teilweise eine sehr lange Halbwertszeit, Adalimumab hat beispielsweise eine Halbwertszeit von 8-9 Tagen. Im Falle des Vorliegens einer Infektion kann durch das Absetzen der Medikation daher keine rechtzeitige Reduktion der im Körper vorhandenen Antikörper erreicht werden, wodurch die Immunsuppression weiter bestehen bleibt. Die Herstellung solcher Antikörper ist ebenfalls sehr aufwendig, da sie nicht synthetisch, sondern rekombinant hergestellt werden (Freissmuth 2012). Das heißt, es wird eine komplementäre DNA, die für das gewünschte Protein kodiert, in einen Organismus gebracht. Dieser Organismus wandelt die DNA dann in eine mRNA um und produziert den gewünschten Antikörper. Aktuell werden die Wirkstoffe für die zugelassenen Medikamente aus *Escherichia coli*, Hefen oder Chinesischen Hamster Ovarial-Zelllinien gewonnen. Teilweise werden Antikörper auch aus *murinen* Zelllinien gewonnen. Um ihre pharmakokinetischen Eigenschaften zu verbessern, werden einige ihrer Sequenzen durch humane Sequenzen ersetzt, wodurch beispielsweise eine längere Halbwertszeit und eine verminderte Immunantwort erreicht werden. Dadurch entstehen chimäre Antikörper, die zum Beispiel im Arthritis-Medikament Infliximab enthalten sind. Auch Adalimumab gehört zu den TNF- α -Antagonisten und besteht aus humanen monoklonalen Immunglobulin Typ G1 (IgG1)-Antikörpern. Der TNF- α spezifische *murine* Antikörper dient dabei als Matrice. Jedoch ruft auch dieser humane Antikörper noch in ca. 5% der behandelten Patienten eine Immunreaktion hervor (Fleischmann und Shealy 2003). Etanercept ist ein Fusionsprotein, bestehend aus einer humanen löslichen TNF-RII-Ligandenbindungsdomäne und der F_c-Fraktion des humanen IgG1. Die TNF-RII-Domäne bindet kompetitiv sowohl an das lösliche, als auch an das membrangebundene TNF- α .

und blockiert dessen Wirkung (Hassett et al. 2018). Diese Medikamente und Wirkstoffe gehören zu den sogenannten *Biologicals* (Biologika). Die oben genannten Zelllinien werden im Labor verändert, sodass sie sich unbegrenzt vermehren und die gewünschten Antikörper produzieren. Während dieser Produktion befinden sich die Zellen in Bioreaktoren, um die optimalen Bedingungen (Temperatur, Nährstoffzufuhr) für das Wachstum der Zellen zu gewährleisten. Das heißt, nur wenn immer die gleichen Bedingungen herrschen, können auch Medikamente mit einer konstanten Qualität und exakten Eigenschaften hergestellt werden. Um die Wirksamkeit der Antikörper zu gewährleisten, müssen der Aufbau und die Struktur des Wirkstoffs überwacht werden, was durch strenge Qualitätskontrollen im Herstellungsprozess gewährleistet werden muss. Um eine überschießende Immunreaktion, beispielsweise ausgelöst durch posttranslationale Modifikationen, zu verhindern, wird Etanercept in Säugerzellen produziert (Almo et al. 2013). Auf Grund dieser sehr aufwendigen Herstellung sind Medikamente aus *Biologicals* im Vergleich zu synthetisch hergestellten Medikamenten sehr teuer (Gulácsi 2014).

Aktuell sind diverse *Biologicals* im Handel erhältlich, die der erfolgreichen therapeutischen Beeinflussung von verschiedenen Entzündungserkrankungen dienen. Jedoch sind diese in ihrer Herstellung und Qualitätskontrolle sehr aufwendig und in der klinischen Praxis mit einigen potenziell schwerwiegenden Nebenwirkungen verbunden. Die Gentherapie könnte eine Alternative für *Biologicals* darstellen und durch die Verwendung von Viromeren in Zukunft ermöglicht werden. Ziel dieser Dissertation war grundlegend zu testen, ob Viromere ein geeignetes Trägermaterial für den benötigten Nukleinsäure-Transport darstellen. Der Vorteil der Viromere ist vor allem die hohe Transfektionsquantität. Viromere verpacken beispielsweise 20-mal mehr RNA als Liposomen (persönliches Gespräch mit Dr. Christian Reinsch, Lipocalyx GmbH). Dadurch wird für die gleiche Transfektionsquantität wesentlich weniger Trägermaterial benötigt, weshalb auch von einer wesentlich geringeren Toxizität der eingesetzten Trägermaterialmenge auszugehen ist. Anhand der Ergebnisse dieser Dissertation ist zu erkennen, dass Viromere geeignete Trägermaterialien für Nukleinsäuren darstellen. In weiteren Untersuchungen muss nun die Pharmakokinetik der ausgewählten Viromer-mRNA-Komplexe analysiert werden, um ein mögliches Behandlungsschema einschließlich Applikationshäufigkeit und Applikationsroute zu erstellen.

6 Zusammenfassung

Edith Jansig

Untersuchungen zur Eignung von Viromeren als neuartige Trägersysteme für die genbasierte Behandlung von Entzündungserkrankungen

Klinik für Kleintiere der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Eingereicht im Juli 2019

92 Seiten, 50 Abbildungen, 63 Tabellen, 102 Literaturangaben, 30 Seiten Anhang

Schlüsselwörter: Viomer, Gentherapie, CCL2, TNF- α , 7ND, sTNF-RII, Thioglykolat-induzierte Peritonitis

Einleitung: Für die Behandlung von Entzündungen gibt es diverse Medikamente mit vielen verschiedenen Wirkstoffen. Ein neuer therapeutischer Ansatz ist die Gentherapie, bei der Nukleinsäuren in den Organismus geschleust werden, um gewünschte Proteine zu produzieren oder die Produktion von entsprechenden Proteinen zu hemmen. Für den Transport der Nukleinsäuren werden diverse Vektoren eingesetzt, wie beispielsweise Lipoplexe oder Polyplexe. Viomere sind neu entwickelte, chemisch synthetisierte Polymere, die zur Transfektion von Säugetierzellen verwendet werden. Viomere werden durch Endozytose von Zellen aufgenommen und transportieren Frachtmoleküle, zum Beispiel Nukleinsäuren ins Zytosol. Diese Nukleinsäuren könnten zur Expression von Zielproteinen aus abgegebenen mRNAs oder Plasmiden, oder durch Abgabe von siRNA-Molekülen in transfizierten Zellen zur Modulation der Genexpression führen. Der angewandte Transfektionsmechanismus leitet sich dabei von Influenzaviren ab, die zum künstlichen Markennamen führen.

Im Rahmen des Projekts wurde die Fähigkeit von Viromeren, Nukleinsäuren *in vivo* abzugeben, untersucht. Daher wurden zwei verschiedene mRNAs ausgewählt, von denen bekannt ist, dass sie die Zytokinfunktion in Tiermodellen modulieren. Die erste ausgewählte Nukleinsäure kodiert für 7ND, einen dominanten negativen Regulator der CCL2-Funktion, ein Chemokin, welches bei der Rekrutierung von Monozyten bei verschiedenen Erkrankungen eine zentrale Rolle spielt. Zusätzlich wurde die mRNA für die lösliche Form des TNF-Rezeptors II ausgewählt, der Hauptkomponente von Etanercept, einem zugelassenen Medikament zur Behandlung von rheumatoider Arthritis.

Zusammenfassung

Ziel der Untersuchung: Das Ziel der Arbeit war die Etablierung eines geeigneten Tiermodells, um die ausgewählten Viromer-Nukleinsäure-Komplexe zu testen. Zusätzlich sollte untersucht werden, welche Auswirkung die ausgewählten Viromer-Nukleinsäure-Komplexe auf die Infiltration der Monozyten in ein entzündetes Gewebe haben.

Tiere, Material und Methoden: Für Machbarkeitstudien wurden RAW-264.7-Zellen mit den ausgewählten Viromer-Nukleinsäure-Komplexen transfiziert und die Konzentration von 7ND und sTNF-RII in den Zellüberständen anschließend mittels ELISA analysiert. Für das Modell der Thioglykolat-induzierten Peritonitis wurden männliche DBA/1 Mäuse verwendet. Um die Biodistribution der exprimierten Proteine zu analysieren, wurde den Versuchstieren eine *firefly*-Luciferase-mRNA appliziert und die 6 bzw. 24 Stunden später entnommen Organe zu einer Luciferin-Lösung hinzugegeben. Das enthaltene Luciferin diente der in der Probe enthaltenen Luciferase als Substrat, bei dessen Umsetzung eine messbare Biolumineszenz auftrat. Für die Analyse der Wirksamkeit der Viromer-Nukleinsäure-Komplexe wurden diese i.v. appliziert und 6 Stunden später eine Peritonitis ausgelöst. 4 Stunden später wurde eine *Peritoneallavage* durchgeführt und die so gewonnen *Peritonealzellen* mittels *fluorescence-activated cell scanning* analysiert. Die das *Peritoneum* infiltrierende Monozytenzahl konnte daraufhin in den einzelnen Versuchen zwischen der Kontrollgruppe und der Behandlungsgruppe mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunn`s *multiple comparison post-hoc*-Test statistisch verglichen werden.

Ergebnisse: In den *Proof-of-Concept*-Versuchen in RAW-Zellen konnte eine gesteigerte 7ND- und sTNF-RII-Konzentration nachgewiesen werden (Kruskal-Wallis-Test und Dunn`s *multiple comparison post-hoc*-Test, 7ND: ** $p = 0,0027$; sTNF-RII: *** $p = 0,005$). Nach der i.v.-Applikation des Viromer-7ND-mRNA-Komplexes konnte eine signifikante Reduktion (** $p = 0,0027$, paarweiser Wilcoxon, Benjamini & Hochberg Post-Test) der Monozytenzahl im Zuge einer induzierten Entzündung gezeigt werden. Nach der i.v.-Applikation des Viromer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes konnte der Trend einer Reduktion der Monozytenzahl gezeigt werden.

Schlussfolgerungen: Zusammenfassend scheinen die Viromere als Vektoren für den Transport von Nukleinsäuren geeignet zu sein. Durch die Applikation eines Viromer-7ND-mRNA-Komplex wird eine Reduktion der infiltrierenden Monozyten erreicht, wodurch dieser Komplex dazu geeignet ist, Entzündungssymptome zu hemmen. Jedoch sollte der Viromer-sTNF-RII-mRNA-Komplex in einem geeigneteren TNF- α -abhängigen Tiermodell getestet werden.

7 Summary

Edith Jansig

Evaluation of viromers as new delivery system for gene-based therapies in inflammatory diseases

Department of Small Animal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Submitted in July 2019

92 pages, 50 figures, 63 tables, 102 references, 30 pages appendix

Keywords: Viromer, gene therapy, CCL2, TNF- α , 7ND, sTNF-RII, thioglycollate-induced peritonitis

Introduction: For the treatment of inflammation, there are various drugs with many different pharmacologic agents. A new therapeutic approach for these conditions is gene therapy, in which nucleic acids are channeled into the organism to produce desired proteins or to inhibit the production of corresponding proteins. Various vectors are used for the transport of the nucleic acids, such as lipoplexes or polyplexes. Viromere are newly developed, chemically synthesized polymers used to transfect mammalian cells. Viromers are taken up by endocytosis of cells and transport cargo molecules, for example, nucleic acids into the cytosol. These nucleic acids can lead to the expression of target proteins from delivered mRNAs or plasmids, or they can modulate gene expression by the delivery of siRNA molecules in transfected cells. The applied transfection mechanism is derived from influenza viruses, which led to the artificial brand name.

The project investigated the ability of viromers to deliver nucleic acids *in vivo*. Therefore, two different mRNAs were chosen that are known to modulate cytokine function in animal models. The first selected nucleic acid encodes 7ND, a dominant negative regulator of CCL2 function, which is a chemokine that plays a key role in the recruitment of monocytes in various diseases. In addition, mRNA was selected for the soluble form of TNF receptor II, the major component of etanercept, an approved drug for the treatment of rheumatoid arthritis.

Aim of the study: The aim of this work was to establish a suitable animal model to test the selected viromer-nucleic acid complexes. In addition, the effect of the selected viromer-nucleic acid complexes on the monocytic infiltration of the inflamed tissue was investigated.

Summary

Animals, materials and methods: For proof-of-concept experiments, RAW-264.7 cells were transfected with the selected viromer-nucleic acid complexes and the concentrations of 7ND and sTNF-RII in the cell supernatants were subsequently analyzed by ELISA. For the model of thioglycollate-induced peritonitis, male DBA/1 mice were used. In order to analyze the biodistribution of the expressed proteins, the test animals were administered a firefly-luciferase-mRNA and selected organs taken 6 and 24 hours later were added to a luciferin solution. Luciferin served as a substrate for the luciferase in the sample, due to its conversion a measurable bioluminescence signal was detectable. To analyze the effectiveness of the viromer-nucleic acid complexes, the complexes were administered intravenously followed by the induction of peritonitis 6 hours later. Peritoneal lavage was carried out 4 hours later and the obtained cells were analyzed by fluorescence-activated cell scanning. In individual experiments, the numbers of monocytes infiltrating the peritoneum were then compared between the treatment group and a control group (Kruskal-Wallis-test and Dunn's multiple comparison post-hoc-test).

Results: In the proof-of-concept experiments, an increased concentration of 7ND and sTNF-RII could be detected in RAW-cells (Kruskal-Wallis-test and Dunn's multiple comparison post-hoc-test, 7ND: ** $p = 0,0027$; sTNF-RII: *** $p = 0,005$). Following intravenous administration of the viromer-7ND mRNA complex, a significant reduction in infiltrating monocyte counts was demonstrated (** $p = 0,0027$; pairs Wilcoxon, Benjamini & Hochberg post-test). Following intravenous administration of the viromer-sTNF-RII mRNA complex, a trend for a reduction in monocyte counts was demonstrated.

Conclusions: In summary, the viromer tested in this study appears to be suitable as a vector for the transport of nucleic acids. The application of a viromer-7ND-mRNA-complex results in a reduction of the infiltrating monocytes, which makes this complex suitable for inhibiting inflammatory symptoms. However, the viromer-sTNF-RII mRNA complex warranted further testing in a potentially more appropriate TNF- α dependent animal model.

8 Literaturverzeichnis

- Almo SC, et al. Protein production from the structural genomics perspective: achievements and future needs. *Curr Opin Struct Biol* 2013; 23(3): 335–44.
- Bigey P, et al. In vivo plasmid DNA electrotransfer. *Curr Opin Biotechnol* 2002; 13(5): 443–7.
- BioRad 2019 Bio-Plex Pro Cytokine, Chemokine and Growth Factor Assays. Online verfügbar unter <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10014905.pdf>. Zuletzt aktualisiert am 03.06.2019.
- Bonafant P, et al. The generation of reactive-oxygen species associated with long-lasting pulse-induced electroporation of mammalian cells is based on a non-destructive alteration of the plasma membrane. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1461(1): 123–34.
- Boussif O, et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(16): 7297–301.
- Brennan FM, et al. Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. *The Lancet* 1989; 2(8657): 244–7.
- Carswell E, et al. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72(9): 3666–70.
- Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 2006; 354(6): 610–21.
- Chollet P, et al. Side-effects of a systemic injection of linear polyethylenimine-DNA complexes. *J Gene Med* 2002; 4(1): 84–91.
- Croft M, Siegel RM. Beyond TNF: TNF superfamily cytokines as targets for the treatment of rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 2017; 13(4): 217–33.
- Cynis H, et al. The isoenzyme of glutaminyl cyclase is an important regulator of monocyte infiltration under inflammatory conditions. *EMBO Mol Med* 2011; 3(9): 545–58.
- Damås JK, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 enhances and interleukin-10 suppresses the production of inflammatory cytokines in adult rat cardiomyocytes. *Basic Res Cardiol* 2001; 96(4): 345–52.
- Deshmane SL, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res* 2009; 29(6): 313–26.
- Egashira K. Molecular mechanisms mediating inflammation in vascular disease: special reference to monocyte chemoattractant protein-1. *Hypertension* 2003; 41(3 Pt 2): 834–41.
- Egger G. Die Akute Entzündung: Grundlagen, Pathophysiologie und klinische Erscheinungsbilder der Unspezifischen Immunität. 1. Aufl. Wien: Springer Verlag 2005.
- Farhood H, et al. The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1235(2): 289–95.
- Felgner J, et al. Cationic lipid-mediated transfection in mammalian cells: “Lipofection”. *J Tissue Cult Meth* 1993; 15(2): 63–8.
- Felgner PL, et al. Nomenclature for synthetic gene delivery systems. *Hum Gene Ther* 1997; 8(5): 511–2.

- Felgner PL, et al. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84(21): 7413–7.
- Fend F, Thomas C. Entzündungen. 2. Auflage. Stuttgart: Schattauer 2001.
- Fernandez E, Lolis E. Structure, Function, and Inhibition of Chemokines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2002; 2002(42): 469–99.
- Fleischmann R, Shealy D. Developing a new generation of TNFalpha antagonists for the treatment of rheumatoid arthritis. *Mol Interv* 2003; 3(6): 310–8.
- Forman HJ, Torres M. Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166(12 Pt 2): S4–8.
- Freissmuth M. Biologika. In: Freissmuth M, Offermanns S, Böhm S, Hrsg. *Pharmakologie & Toxikologie*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2012. S. 88–94.
- Gallily R, et al. Effect of Cortisone of Genetic Resistance to Mouse Hepatitis Virus in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1964; 51: 1158–64.
- Genetics Engineering & Biotechnology News 2014 Transfection: Viral and Synthetic Techniques Converge | GEN - Genetic Engineering and Biotechnology News. Online verfügbar unter <https://www.genengnews.com/magazine/218/transfection-viral-and-synthetic-techniques-converge/5136/#gsaccess>. Zuletzt überprüft am 03.06.2019
- Geng W et al. 2012 Multiplex Analysis of Inflammatory Markers Using Bio-Plex Pro™ Human Th17 Cytokine Assays. Online verfügbar unter <http://www.bioradiations.com/multiplex-analysis-of-inflammatory-markers-using-bio-plex-pro-human-th17-cytokine-assays/>. Zuletzt überprüft am 03.06.2019
- Gerszten R, et al. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under low conditions. *Nat Immunol* 1999; 1999(398(6729)): 718–23.
- Gesellschaft für Versuchstierkunde/ Society for Laboratory Animal Science. Tiergerechte Haltung von Labormäusen. Fachinformation 2014.
- Gesellschaft für Versuchstierkunde/ Society for Laboratory Animal Science (GV-SOLAS) & Tierärztliche Vereinigung für Tierschutz e.V. Empfehlung zur Substanzapplikation bei Versuchstieren. Merkblatt 2010.
- Grell M, et al. The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(2): 570–5.
- Grosse S, et al. Which mechanism for nuclear import of plasmid DNA complexed with polyethylenimine derivatives? *J Gene Med* 2006; 8(7): 845–51.
- Gu L, et al. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell* 1998; (2(2)): 275–81.
- Gulácsi L. Biological and biosimilar therapies in inflammatory conditions: challenges for the Central and Eastern European countries. *Eur J Health Econ* 2014; 15 Suppl 1: S1–4.
- Hallek M, et al. Grundlagen der Gentherapie. *Internist* 2001; 42(10): 1306–13.
- Hassett B, et al. Manufacturing history of etanercept (Enbrel®): Consistency of product quality through major process revisions. *MAbs* 2018; 10(1): 159–65.
- Heel KA, Hall JC. Peritoneal defences and peritoneum-associated lymphoid tissue. *Br J Surg* 1996; 83(8): 1031–6.
- Holmes KL, et al. Flow cytometry analysis using the Becton Dickinson FACS Calibur. *Curr Protoc Immunol* 2002; (Supplement 49): 5.4–5.4.22.

- Huang DR, et al. Absence of monocyte chemoattractant protein 1 in mice leads to decreased local macrophage recruitment and antigen-specific T helper cell type 1 immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 2001; 193(6): 713–26.
- Jiang Y, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. *J Immunol* 1992; 148(8): 2423–8.
- Jinek M, Doudna JA. A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature* 2009; 457(7228): 405–12.
- Johnson PG, et al. A pulsed electric field enhances cutaneous delivery of methylene blue in excised full-thickness porcine skin. *J Invest Dermatol* 1998; 111(3): 457–63.
- Kawabata K, et al. The fate of plasmid DNA after intravenous injection in mice: involvement of scavenger receptors in its hepatic uptake. *Pharm Res* 1995; 12(6): 825–30.
- Kaya Z, et al. Comparison of IL-10 and MCP-1-7ND gene transfer with AAV9 vectors for protection from murine autoimmune myocarditis. *Cardiovasc Res* 2011; 91(1): 116–23.
- Kirchheis R, et al. Polycation-based DNA complexes for tumor-targeted gene delivery in vivo. *J Gene Med* 1999; 1(2): 111–20.
- Kitamoto S, Egashira K. Gene therapy targeting monocyte chemoattractant protein-1 for vascular disease. *J Atherosclerosis Thromb* 2002; 9(6): 261–5.
- Koch AE, et al. Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 1992; 90(3): 772–9.
- Kohidai, L. CC BY 3.0 2008 Struktur der Chemokine. Online verfügbar unter <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=4087450>. Zuletzt geprüft am 03.06.2019
- Lam D, et al. Inflammatory mediator profiling reveals immune properties of chemotactic gradients and macrophage mediator production inhibition during thioglycollate elicited peritoneal inflammation. *Mediators Inflamm* 2013; 2013: 931562.
- Li YM, et al. Glycation products in aged thioglycollate medium enhance the elicitation of peritoneal macrophages. *J Immunol Methods* 1997; 201(2): 183–8.
- Lipocalyx GmbH 2017 Viromer_Factbook. Online verfügbar unter <http://www.lipocalyx.de/wp-content/uploads/2017/05/viromer-transfection-factbook.pdf>. Zuletzt geprüft am 03.06.2019
- Litzinger DC, et al. Fate of cationic liposomes and their complex with oligonucleotide in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1281(2): 139–49.
- Liu X, Quan N. Immune Cell Isolation from Mouse Femur Bone Marrow. *Bio Protoc* 2015; 5(20):
- Lu B, et al. Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. *J Exp Med* 1998; (187 (4)): 601–8.
- MacEwan DJ. TNF ligands and receptors--a matter of life and death. *Br J Pharmacol* 2002; (135): 855–75.
- MacGavin MD, Zachary JF. Pathologie der Haustiere: Allgemeine, spezielle und funktionelle Veterinärpathologie. München: Urban & Fischer in Elsevier 2009.
- Mackay F, et al. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)-induced cell adhesion to human endothelial cells is under dominant control of one TNF receptor type, TNF-R55. *J Exp Med* 1993; 193(177(5)): 1277–86.

- Manchekar M, et al. Phospholipid transfer protein plays a major role in the initiation of apolipoprotein B-containing lipoprotein assembly in mouse primary hepatocytes. *J Biol Chem* 2015; 290(13): 8196–205.
- Medina-Kauwe LK, et al. Intracellular trafficking of nonviral vectors. *Gene Ther* 2005; 12(24): 1734–51.
- Mir LM, et al. Introduction of definite amounts of nonpermeant molecules into living cells after electroporation: direct access to the cytosol. *Exp Cell Res* 1988; 175(1): 15–25.
- Moreland LW, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with a recombinant human tumor necrosis factor receptor (p75)-Fc fusion protein. *N Engl J Med* 1997; 337(3): 141–7.
- Moreland LW, et al. Etanercept therapy in rheumatoid arthritis. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 1999; 130(6): 478–86.
- Mori E, et al. Essential role of monocyte chemoattractant protein-1 in development of restenotic changes (neointimal hyperplasia and constrictive remodeling) after balloon angioplasty in hypercholesterolemic rabbits. *Circulation* 2002; 105(24): 2905–10.
- Moser B, et al. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends in Immunol* 2004; 25(2): 75–84.
- Ni W, et al. New anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation* 2001; 103(16): 2096–101.
- Nishikawa M, Huang L. Nonviral vectors in the new millennium: delivery barriers in gene transfer. *Hum Gene Ther* 2001; 12(8): 861–70.
- Ogris M, et al. PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. *Gene Ther* 1999; 6(4): 595–605.
- Panzner S. Transfection: Viral and Synthetic Techniques Converge. *Genet Eng Biotechnol* 2014; 34(4): 20–1.
- Park I-K, et al. Differential effects of decoy chemokine (7ND) gene therapy on acute, biphasic and chronic autoimmune encephalomyelitis: implication for pathomechanisms of lesion formation. *J Neuroimmunol* 2008; 194(1-2): 34–43.
- Pasparakis M, et al. Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. *J Exp Med* 1996; 196(184(4)): 1397–411.
- Pertoft H, et al. Separation of human monocytes on density gradients of Percoll. *J Immunol Methods* 1980; 33(3): 221–9.
- Prazeres DMF, Monteiro GA. Plasmid Biopharmaceuticals. *Microbiol Spectr* 2014; 2(6): 1–10.
- Proudfoot A, et al. Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; (vol.100 no.4): 1885–90.
- Rao S, et al. The Comparative Utility of Viromer RED and Lipofectamine for Transient Gene Introduction into Glial Cells. *BioMed Res Int* 2015; 2015: 458624.
- Robbins PD, Ghivizzani SC. Viral vectors for gene therapy. *Pharmacol Ther* 1998; 80(1): 35–47.
- Rollins BJ. Chemokines. *Blood* 1997; 1997(90): 909–28.

- Rollins BJ, et al. Recombinant human MCP-1/JE induces chemotaxis, calcium flux, and the respiratory burst in human monocytes. *Blood* 1991; (78(4)): 1112–6.
- Ryan GB, Majno G. Acute inflammation. A review. *Am J Pathol* 1977; 86(1): 183–276.
- Schmeer M, et al. Plasmid DNA Manufacturing for Indirect and Direct Clinical Applications. *Hum Gene Ther* 2017; 28(10): 856–61.
- Schulze-Bergkamen. Grundlagen der onkologischen Therapie. 1. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag 2008.
- Sheng Y, et al. TNF Receptor 2 Makes Tumor Necrosis Factor a Friend of Tumors. *Front Immunol* 2018; 9: 1170.
- Shihata WA, et al. Caveolae: A Role in Endothelial Inflammation and Mechanotransduction? *Front Physiol* 2016; 7: 628.
- Singh UP, et al. Chemokine and cytokine levels in inflammatory bowel disease patients. *Cytokine* 2016; 77: 44–9.
- Speeckaert MM, et al. Tumor necrosis factor receptors: biology and therapeutic potential in kidney diseases. *Am J Nephrol* 2012; 36(3): 261–70.
- Spoettl T, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) inhibits the intestinal-like differentiation of monocytes. *Clin Exp Immunol* 2006; 145(1): 190–9.
- Takahashi M, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), not MCP-3, is the primary chemokine required for monocyte recruitment in mouse peritonitis induced with thioglycollate or zymosan A. *J Immunol* 2009; 183(5): 3463–71.
- Tiera M, et al. Synthetic and Natural Polycations for Gene Therapy: State of the Art and New Perspectives. *Curr Gene Ther* 2006; 6(1): 59–71.
- Tousignant JD, et al. Comprehensive analysis of the acute toxicities induced by systemic administration of cationic lipid:plasmid DNA complexes in mice. *Hum Gene Ther* 2000; 11(18): 2493–513.
- Usui M, et al. Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy inhibits restenotic changes (neointimal hyperplasia) after balloon injury in rats and monkeys. *FASEB J* 2002; 16(13): 1838–40.
- Vaddi K, Newton RC. Regulation of monocyte integrin expression by beta-family chemokines. *J Immunol* 1994; 153(10): 4721–32.
- van Coillie E, et al. The MCP/eotaxin subfamily of CC chemokines. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996; 1996(10): 61–86.
- van Furth R, Cohn ZA. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med* 1968; 128(3): 415–35.
- van Mierlo GJD, et al. Cutting edge: TNFR-shedding by CD4+CD25+ regulatory T cells inhibits the induction of inflammatory mediators. *J Immunol* 2008; 180(5): 2747–51.
- Verma IM, Somia N. Gene therapy -- promises, problems and prospects. *Nature* 1997; 389(6648): 239–42.
- Wagner W, et al. Molecular and secretory profiles of human mesenchymal stromal cells and their abilities to maintain primitive hematopoietic progenitors. *Stem cells* 2007; 25(10): 2638–47.
- Williams TJ. Oedema and vasodilatation in inflammation: the relevance of prostaglandins. *Postgrad Med J* 1977; 53(625): 660–2.

- Wolff JA, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 1990; 247: 1465–8.
- Wolff JA, et al. Conditions affecting direct gene transfer into rodent muscle in vivo. *BioTechniques* 1991; 11(4): 474–85.
- Wu VY, et al. Purification and characterization of human and bovine platelet factor 4. *Prep Biochem* 1977; 7(6): 479–93.
- Yadav A, et al. MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review. *Clin Chim Acta* 2010; 411(21-22): 1570–9.
- Yang NS, et al. In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87(24): 9568–72.
- Yang S, et al. Role of TNF-TNF Receptor 2 Signal in Regulatory T Cells and Its Therapeutic Implications. *Front Immunol* 2018; 9: 784.
- Zabner J, et al. Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *J Biol Chem* 1995; 270(32): 18997–9007.
- Zhang Y, Rollins BJ. A dominant negative inhibitor indicates that monocyte chemoattractant protein 1 functions as a dimer. *Mol Cell Biol* 1995; 15(9): 4851–5.
- Zhang YJ, et al. Structure/activity analysis of human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) by mutagenesis. Identification of a mutated protein that inhibits MCP-1-mediated monocyte chemotaxis. *J Biol Chem* 1994; 269(22): 15918–24.

9 Danksagung

Als erstes möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Romy M. Heilmann bedanken, die mir ermöglichte diese Dissertation an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig einzureichen. Insbesondere danke ich Ihr für das stete Interesse am Fortschritt und Gelingen der Arbeit.

Ein ebenso großer Dank gilt Prof. Dr. Hans-Ulrich Demuth, der es mir ermöglichte am Fraunhofer IZI-MWT in Halle eine externe Dissertation zu erstellen.

Bei der Firma Lipocalyx GmbH, insbesondere bei Dr. Steffen Panzner und Dr. Christian Reinsch, möchte ich mich vor allem für die zur Verfügung gestellten Substanzen, aber auch für die gute Kooperation bedanken.

Besonderer Dank gilt Dr. Holger Cynis, der mich so freundlich in seine Arbeitsgruppe aufnahm, mir dieses interessante Thema zur Verfügung stellte und mich stets mit Rat und Tat bei der Erstellung der Dissertation unterstützte.

Mein herzlicher Dank gilt allen Mitarbeitern der AG Cynis, sowie allen anderen Mitarbeitern des IZI-MWT, die mich stets tatkräftig mit Ideen oder helfenden Händen bei verschiedenen Experimenten unterstützt haben.

Dr. Vera Nykiel möchte ich für die gründliche Einarbeitung in die tierexperimentellen Arbeitstechniken, aber vor allem für die moralische Unterstützung, die vielen aufmunternden Gespräche und das immer offene Ohr danken.

Sebastian Wussow danke ich für die Unterstützung bei der graphischen Darstellung und statistischen Auswertung meiner Ergebnisse.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie für ihre motivierende Unterstützung, Geduld und Nachsichtigkeit bedanken. Ganz besonderer Dank gilt Mathias und Benjamin. Ohne eure Unterstützung mittels Krisensitzungen, Kreativpausen und Labor-Nachhilfe-Stunden hätte ich diese Arbeit nicht geschafft.

10 Anhang

10.1 Materialien

Tab. 14 Geräte/Software

Material	Hersteller	
96-Well Plate –Reader GLOMAX	Promega	Wisconsin (USA)
Bio-Plex 200	BioRad	Puchheim
CASYton	OMNI Life Science	Bremen
COBAS c311	Roche	Basel
Dampfsterilisator Varioklav 400 E	H+P Labortechnik AG	Oberschleißheim
FACS Calibur	Becton Dickinson	Heidelberg
FlowJo	FlowJo LLC	Ashland (USA)
Gerätesoftware Cell Quest Pro	Becton Dickinson	Heidelberg
Gerätesoftware XFluor4	Tecan Group	Männedorf (Schweiz)
GraphPad PRISM 5.0	GraphPad	San Diego (USA)
Inkubator B6 Funktion line	Heraeus	Hanau
Laborpipetten diverse Größen	Eppendorf	Hamburg
Präzisionswaage Kern PEJ 4200	Kern & Sohn GmbH	Ballingen
SPECTRAFluor Plus	Tecan Group	Männedorf
Sterilwerkbank KR-130	Kojair Tech Oy	Vilppula (Finnland)
Thermoshaker Neolab Migge DTS-4	neoLab®	Heidelberg
Vortex REAX top	Heidolph	Schwabach
Vortex Genie 2	Scientific Industries	Bohemia (USA)
Zentrifuge Beckmann Allegra 21	Beckmann-Coulter	Krefeld
Zentrifuge Beckmann Allegra 21 R	Beckmann-Coulter	Krefeld
Zentrifuge Mini Star 7200 UpM	neoLab®	Heidelberg

Anhang

Tab. 15 Chemikalien

Material	Hersteller	
Ammoniumchlorid 99,5%	Roth	Karlsruhe
Collagenase IV	Life Technologies GmbH	Darmstadt
DNase I	Roche Diagnostics GmbH	Mannheim
Ethylendiamin-Tetraessigsäure	Roth	Karlsruhe
Kaliumhydrogencarbonat 99,7%	Life Technologies GmbH	Darmstadt
Natrium-Chlorid 0,9%	Henry Schein	Hamburg
Natrium-Chlorid 99%	Roth	Karlsruhe
Percoll®	GE Healthcare	Chicago (USA)

Tab. 16 Glas- und Plastikware

Material	Hersteller	
CASYcups	OMNI Life Science	Bremen
Cell-Strainer 40 µm/ 100 µm	BD Bioscience	New Jersey (USA)
Pipettenspitzen diverse Größen	Eppendorf	Hamburg
Rundbodenröhrchen 5 ml Polystyrol	Corning Science	Reynosa (Mexiko)
Schottflasche diverse Größen	Duran®	Mainz
Trucount™ Röhrchen	BD Bioscience	New Jersey (USA)
Zellkulturflaschen 75 cm²	Greiner	Frickenhausen
Zellkulturplatten diverse Größen	Greiner	Frickenhausen

Tab. 17 Antikörper FACS und Bio-Plex (Kits)

Material	Hersteller	
Beetle Lysis Juice	PJK Biotech	Kleinblittersdorf
Bio-Plex Pro Mouse Zytokin CCL2	Bio-Rad	München
Bio-Plex Pro Mouse Zytokin IL-1 β	Bio-Rad	München
Bio-Plex Pro Mouse Zytokin IL-6	Bio-Rad	München
Bio-Plex Pro Mouse Zytokin IL-10	Bio-Rad	München
Bio-Plex Pro Mouse Zytokin IFN- γ	Bio-Rad	München
Bio-Plex Pro Mouse Zytokin MIP-1 α	Bio-Rad	München
Bio-Plex Pro Mouse Zytokin MIP-1 β	Bio-Rad	München
Bio-Plex Pro Mouse Zytokin RANTES	Bio-Rad	München
Bio-Plex Pro Mouse Zytokine 1 Standards	Bio-Rad	München
Bio-Plex Pro Mouse Zytokin TNF- α	Bio-Rad	München
Bio-Plex Pro Reagent Kit 5 Flat Plate	Bio-Rad	München
CD16/32	Life Technologies GmbH	Darmstadt
Human Soluble sTNF-RII ELISA Kit	RayBiotech Life	Norcross (USA)
Ly-6G-PerCP-Vio700	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach
Ly-6B.2-Alexa Fluor 647	Bio-Rad Antibodies	Puchheim
Mouse MCP-1 Platinum ELISA	Life Technologies GmbH	Darmstadt

Tab. 18 Zubehör und Kulturmedien für die Zellkultur

Material	Hersteller	
DMEM	Life Technologies GmbH	Darmstadt
Fetales Kälberserum (FBS)	Life Technologies GmbH	Darmstadt
FLuc-mRNA	TriLink Biotechnologies	San Diego (USA)
Hank`s Balanced Salt Solution (HBSS) 1x	Life Technologies GmbH	Darmstadt
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) 1x	Life Technologies GmbH	Darmstadt
RAW 246.7	Cell lines service	Eppelheim
Trypsin-EDTA 0,05%	Life Technologies GmbH	Darmstadt
Viomer®Red	Lipocalyx GmbH	Halle, Saale

Tab. 19 Behandlungssubstanzen und Viomere

Material	Hersteller	
7ND-mRNA	TriLink Biotechnologies	San Diego (USA)
Isofluran CP 1 ml/ml	CP-pharma	Burgdorf
Natrium-Chlorid 0,9 %	Henry Schein	Hamburg
RNase freies Wasser	Lonza	Basel
sTNF-RII-mRNA	TriLink Biotechnologies	San Diego (USA)
Thioglykolat Medium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	St. Louis (USA)
Viomer®In Vivo	Lipocalyx GmbH	Halle (Saale)
Viomer-Puffer	Lipocalyx GmbH	Halle (Saale)

Tab. 20 Verwendete Geräte/ Materialien im Tierversuch

Material	Hersteller	
Futter (Maus - Zucht)	ssniff	Soest
Käfige IVC Typ II, lang	Tecniplast	Hohenpeißenberg
Kanülen 27 G, 23 G, 21 G	Henry Schein	Hamburg
Laborwaage 2 kg/ 0,1 g	Kern & Sohn GmbH	Balingen
Narkosegerät Trajan 808	Dräger	Lübeck
Skalpell Größe 21	Henry Schein	Hamburg
S-Monovette Lithium-Heparin	Sarstedt	Nümbrecht
Spritzen diverse Größen	Henry Schein	Hamburg
Tischzentrifuge Universal 320R	Hettich	Kirchlengern

10.2 Ergebnistabellen

Transfektionsversuch in RAW 246.7-Zellen

Tab. 21 7ND-Konzentration transfizierter RAW-Zellüberstände

	6h UK	24h UK	30h UK	6h	24h	30h
Konzentration [ng/ml]	10814	19243	15529	50671	71386	119957
	20386	40243	30529	28386	131814	190814
				27100	116671	86957
				65671	175529	304243
				85814	134529	254814
				45100	139243	204529
Mittelwert	15600	29743	23029	50457	128195	193552
Median	15600	29743	23029	47886	133172	197672
Standardabweichung	4786	10500	7500	20587	31026	74063

Tab. 22 sTNF-RII-Konzentration transfizierter RAW-Zellüberstände

	6h UK	24h UK	30h UK	6h	24h	30h
Konzentration [ng/ml]	6800	5792	7208	7533	47892	69817
	7108	6192	7192	12808	36383	71525
				11708	46808	77500
				7017	46542	73092
				13950	44225	78933
				11783	36508	74283
Mittelwert	6954	5992	7200	10800	43060	74192
Median	6954	5992	7200	11746	45384	73688
Standardabweichung	154	200	8	2605	4803	3186

Biodistribution *firefly*-Luciferase-mRNA

Tab. 23 Biolumineszenz nach 6h: i.v.-Applikation des Viromer-FLuc-mRNA-Komplexes

	PBS				FLuc-mRNA			
	Milz	Leber	Blut	Knochen -mark	Milz	Leber	Blut	Knochen -mark
Konzentration [ng/ml]	6	4	6	3	136173	20	74257	542
	8	5		2	73586	21		1246
	5	8		4	52862	17		235
	5	10		4	81797	18		2808
Mittelwert	6	7	6	3	86105	19	74257	1208
Median	6	7	6	4	77692	19	74257	894
Standard- abweichung	1	2	0	1	30770	2	0	994

Tab. 24 Biolumineszenz nach 24h: i.v.-Applikation des Viromer-FLuc-mRNA-Komplexes

	PBS				FLuc-mRNA			
	Milz	Leber	Blut	Knochen -mark	Milz	Leber	Blut	Knochen -mark
Konzentration [ng/ml]	16	16	19	21	1188	13	7602	118
	8634*	12		16	1944	10		18
	9	15		21	1430	15		21
	7	8		21	1314	21		30
Mittelwert	11	13	19	20	1469	15	7602	47
Median	9	14	19	21	1372	14	7602	26
Standard- abweichung	4	3	0	2	287	4	0	41

*wurde auf Grund der starken Abweichung zu den anderen Messwerten als Ausreißer definiert

Tab. 25 Biolumineszenz nach 6h: i.p.-Applikation des Viromer-FLuc-mRNA-Komplexes

	PBS				FLuc-mRNA			
	Milz	Leber	Blut	Knochen -mark	Milz	Leber	Blut	Knochen -mark
Konzentration [ng/ml]	2	10	17	6	297851	97	13631	13303
	13	5		3	219678	8		15550
	3	5		7	407282	9		23825
	8	4		8	12827	67		86
Mittelwert	7	6	17	6	234410	45	13631	13191
Median	6	5	17	7	258765	38	13631	14427
Standard- abweichung	4	2	0	2	144244	38	0	8521

Tab. 26 Biolumineszenz nach 24h: i.p.-Applikation des Viromer-FLuc-mRNA-Komplexes

Konzentration [ng/ml]	PBS				FLuc-mRNA			
	Milz	Leber	Blut	Knochen -mark	Milz	Leber	Blut	Knochen -mark
	6	3	18	17	1079	9	11551	7150
	6	7		12	57872	4		2834
	7	3		7	9905	10		205
	1	4		8	16506	10		935
Mittelwert	5	4	18	11	21341	8	11551	2781
Median	6	4	18	10	13206	10	11551	1885
Standard- abweichung	2	2	0	4	21790	2	0	2699

Tab. 27 Biolumineszenz im Modell der Thioglykolat-induzierten Peritonitis

Konzentration [ng/ml]	PBS				FLuc-mRNA			
	Milz	Leber	Lavage -Zellen	Knochen -mark	Milz	Leber	Lavage -Zellen	Knochen -mark
	7	8	15	7	3070609	4090	2369	7419
	17	8	18	2	2544997	3778	277	5658
	122	36	12	45	1638725	3346	1065	9992
Mittelwert	49	17	15	18	2418110	3738	1237	7690
Median	17	8	15	7	2544997	3778	1065	7419
Standard- abweichung	52	13	2	19	591410	305	863	1780

Tab. 28 Biodistribution: Quantifizierung der 7ND-mRNA, vergleichend

	Knochenmark	Plasma	Leber	Milz	Lavagezellen
x-fach vs. Kontrolle	1376,67	153,108	41,537	79,884	5,269
	1684,808	166,859	74,545	27,778	7,865
	1610,966	170,939	53,832	57,092	3,505
	673,544	115,889	42,426	46,482	4,049
	867,493	152,399	48,865	27,701	16,355
	2293,698	201,922	39,047	26,87	20,056
	681,183	173,654	29,217	26,93	17,167
	1265,77	130,653	41,926	20,84	12,144
Mittelwert	1307	158	46	39	11
Median	1321	160	42	28	10
Standard- abweichung	525	25	13	19	6

Tab. 29 Biodistribution: Quantifizierung der 7ND-mRNA im Plasma

	Viromer -Puffer + NaCl	FLuc-mRNA + Thio	Viromer-Puffer + Thio	7ND-mRNA + Thio
x-fach vs. Kontrolle	1,478	0,521	1,027	153,108
	0,522	0,75	0,507	166,859
		0,579	0,901	170,939
		0,981	1,631	115,889
		0,802	1,028	152,399
		0,892	0,621	201,922
		0,919	2,906	173,654
				130,653
Mittelwert	1	1	1	158
Median	1	1	1	160
Standard- abweichung	0	0	1	25

Tab. 30 Biodistribution: Quantifizierung der 7ND-mRNA im Knochenmark

	Viromer -Puffer + NaCl	FLuc-mRNA + Thio	Viromer-Puffer + Thio	7ND-mRNA + Thio
x-fach vs. Kontrolle	1,156	2,151	5,209	1376,67
	0,844	4,568	0,762	1684,808
		2,323	2,223	1610,966
		5,095	8,629	673,544
		7,659	1,432	867,493
		2,549	3,167	2293,698
		3,86	8,734	681,183
				1265,77
Mittelwert	1	4	4	1307
Median	1	4	3	1321
Standard- abweichung	0	2	3	525

Tab. 31 Biodistribution: Quantifizierung der 7ND-mRNA in der Leber

	Viromer -Puffer + NaCl	FLuc-mRNA + Thio	Viromer-Puffer + Thio	7ND-mRNA + Thio
x-fach vs. Kontrolle	1,691	6,14	0,98	41,537
	0,309	7,207	1,221	74,545
		11,129	1,654	53,832
		9,247	1,04	42,426
		6,643	1,266	48,865
		5,344	0,943	39,047
		7,101	1,374	29,217
				41,926
Mittelwert	1	8	1	46
Median	1	7	1	42
Standard- abweichung	1	2	0	13

Tab. 32 Biodistribution: Quantifizierung der 7ND-mRNA in der Milz

	Viromer -Puffer + NaCl	FLuc-mRNA + Thio	Viromer-Puffer + Thio	7ND-mRNA + Thio
x-fach vs. Kontrolle	1,606	4,95	0,442	79,884
	0,394	2,377	0,826	27,778
		3,523	0,972	57,092
		2,622	0,59	46,482
		3,744	0,478	27,701
		1,372	0,811	26,87
		2,319	0,674	26,93
				20,84
Mittelwert	1	3	1	39
Median	1	3	1	28
Standard- abweichung	1	1	0	19

Tab. 33 Biodistribution: Quantifizierung der 7ND-mRNA in den Lavagezellen

	Viromer -Puffer + NaCl	FLuc-mRNA + Thio	Viromer-Puffer + Thio	7ND-mRNA + Thio
x-fach vs. Kontrolle	1,203	0,915	0,443	5,269
	0,797	0,362	0,575	7,865
		0,702	0,76	3,505
		0,338	0,822	4,049
		0,42	0,431	16,355
		0,649	0,346	20,056
		0,791	0,389	17,167
				12,144
Mittelwert	1	1	1	11
Median	1	1	0	10
Standard- abweichung	0	0	0	6

Toxizitätstest: Analyse der Aktivität der Aspartat-Aminotransferase (AST), Alanin-Aminotransferase (ALT) und Laktat-Dehydrogenase (LDH)

Tab. 34 Toxizitätsanalyse: i.v.-Applikation des Viromer-7ND-mRNA-Komplexes

	AST [U/l]	ALT [U/l]	LDH [U/l]
Unbehandelt	94,9	33,6	542
Viromer-Puffer + Thio	235,5	44,6	670
	146,4	46	228
	298,3	50,2	721
	124,5	51,8	370
Mittelwert	201	48	497
Median	191	48	520
Standardabweichung	70	3	205
7ND-mRNA + Thio	192	49,2	463
	170,2	45,1	578
	164,2	35,4	38
	248,4	44,2	526
Mittelwert	194	43	401
Median	181	45	495
Standardabweichung	33	5	214

Tab. 35 Toxizitätsanalyse: i.v.-Applikation des Viromer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes

	AST [U/l]	ALT [U/l]	LDH [U/l]
Unbehandelt	89,4	45,5	145
Viromer-Puffer + Thio	98,8	39	183
	136,8	42,1	193
	111,8	42,4	155
	135,9	49,6	178
Mittelwert	121	43	177
Median	124	42	181
Standardabweichung	16	4	14
7ND-mRNA + Thio	254,1	64,8	721
	235,2	50,2	743
	237,7	52,5	717
	276,6	62,1	799
Mittelwert	251	57	745
Median	246	57	732
Standardabweichung	17	6	33

Effektivität des zu testenden Viomer 7ND-mRNA-Komplexes im Modell der Thioglykolat-induzierten Peritonitis

Tab. 36 Effektivität des Viomer-7ND-mRNA-Komplexes: i.v.-Applikation

	Monozyten [Zellzahl]	Granulozyten [Zellzahl]
Unbehandelt	0	163
PBS + Thio	156	20619
	61	10456
	77	11106
Mittelwert	74	10586
Median	69	10781
Standardabweichung	56	7239
7ND-mRNA + Thio	16	6924
	59	10563
	9	535
Mittelwert	28	6007
Median	16	6924
Standardabweichung	22	4145

Tab. 37 Reproduzierbarkeit der i.v.-Applikation des Viomer-7ND-mRNA-Komplexes

	Monozyten [Zellzahl]	Granulozyten [Zellzahl]
Viomer-Puffer + NaCl	24	20
	11	25
	11	24
	32	61
Mittelwert	20	33
Median	18	25
Standardabweichung	9	17
Viomer-Puffer + Thio	656	14025
	553	13462
	338	20620
	345	11485
Mittelwert	473	14898
Median	449	13744
Standardabweichung	136	3436
7ND-mRNA + Thio	309	16910
	60	14187
	270	18492
	174	12929
Mittelwert	203	15630
Median	222	15549
Standardabweichung	96	2191

Tab. 38 Effektivität des Viromer-FLuc-mRNA-Komplexes

	Monozyten [Zellzahl]	Granulozyten [Zellzahl]
Viromer-Puffer + NaCl	70	13
	42	59
	45	7
Mittelwert	52	26
Median	45	13
Standardabweichung	13	23
Viromer-Puffer + Thio	537	18727
	283	7959
	697	18328
Mittelwert	506	15005
Median	537	18328
Standardabweichung	170	4985
FLuc-mRNA + Thio	299	18864
	500	28515
	342	32775
Mittelwert	380	26718
Median	342	28515
Standardabweichung	86	5820

Tab. 39 Effektivität des Viromer-7ND-mRNA-Komplexes: i.p.-Applikation

	Monozyten [Zellzahl]	Granulozyten [Zellzahl]
Unbehandelt	0	0
PBS + Thio	457	16492
	419	1247
	401	26008
Mittelwert	426	14582
Median	419	16492
Standardabweichung	23	10198
7ND-mRNA + Thio	3131	30668
	4866	60812
	4953	56680
Mittelwert	4317	49387
Median	4866	56680
Standardabweichung	839	13343

Tab. 40 Vergleich i.p.- und i.v.-Applikation des Viromer-7ND-mRNA-Komplexes

	Monozyten [Zellzahl]	Granulozyten [Zellzahl]
Unbehandelt	0	163
	0	0
PBS i.p. + Thio	457	16492
	419	1247
	401	26008
Mittelwert	426	14582
Median	419	16492
Standardabweichung	23	10198
PBS i.v. + Thio	207	19462
	101	9131
	106	11662
Mittelwert	138	13418
Median	106	11662
Standardabweichung	49	4397
7ND-mRNA i.p. + Thio	3131	30668
	4866	60812
	4953	56680
Mittelwert	4317	49387
Median	4866	56680
Standardabweichung	839	13343
7ND-mRNA i.v. + Thio	16	6924
	59	10563
	9	535
Mittelwert	28	6007
Median	16	6924
Standardabweichung	22	4145

Effektivität des zu testenden Viromer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes im Modell der Thioglykolat-induzierten Peritonitis

Tab. 41 Effektivität des Viromer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes: i.v.-Applikation

	Monozyten [Zellzahl]	Granulozyten [Zellzahl]
Unbehandelt	32	108
Viromer-Puffer + Thio	1088	47977
	415	21127
	269	21890
	309	16087
Mittelwert	520	26770
Median	362	21509
Standardabweichung	332	12445
sTNF-RII-mRNA + Thio	160	9341
	229	34186
	138	20569
	419	29143
Mittelwert	237	23310
Median	195	24856
Standardabweichung	111	9420

Tab. 42 Reproduzierbarkeit der i.v.-Applikation des Viromer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes

	Monozyten [Zellzahl]	Granulozyten [Zellzahl]
Viromer-Puffer + NaCl	70	13
	42	59
	45	7
Mittelwert	52	26
Median	45	13
Standardabweichung	13	23
Viromer-Puffer + Thio	537	18727
	283	7959
	697	18328
Mittelwert	506	15005
Median	537	18328
Standardabweichung	170	4985
sTNF-RII-mRNA + Thio	353	25887
	240	20750
	119	20741
Mittelwert	237	22459
Median	240	20750
Standardabweichung	96	2424

Tab. 43 Effektivität des Viromer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes: i.p.-Applikation

	Monozyten [Zellzahl]	Granulozyten [Zellzahl]
Unbehandelt	0	0
PBS + Thio	457	16492
	419	1247
	401	26008
Mittelwert	426	14582
Median	419	16492
Standardabweichung	23	10198
sTNF-RII-mRNA + Thio	5863	56574
	8787	83518
	6032	45883
Mittelwert	6894	61992
Median	6032	56574
Standardabweichung	1340	15835

Tab. 44 Vergleich i.p.- und i.v.-Applikation des Viromer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes

	Monozyten [Zellzahl]	Granulozyten [Zellzahl]
Unbehandelt	32	108
	0	0
PBS i.p. + Thio	457	16492
	419	1247
	401	26008
Mittelwert	426	14582
Median	419	16492
Standardabweichung	23	10198
Viromer-Puffer i.v. + Thio	1088	47977
	415	21127
	269	21890
	309	16087
Mittelwert	520	26770
Median	362	21509
Standardabweichung	332	12445
sTNF-RII-mRNA i.p. + Thio	5863	56574
	8787	83518
	6032	45883
Mittelwert	6894	61992
Median	6032	56574
Standardabweichung	1340	15835
sTNF-RII-mRNA i.v. + Thio	160	9341
	229	34186
	138	20569
	419	29143
Mittelwert	237	23310
Median	195	24856
Standardabweichung	111	9420

Tab. 45 Zusammenfassender Versuch: Viromer-7ND- bzw. -sTNF-RII-mRNA-Komplexe

	Monozyten [Zellzahl]	Granulozyten [Zellzahl]
Viromer-Puffer + Thio	165	7111
	87	6849
	111	10075
	160	7339
	261	13627
	145	8317
	183	8357
Mittelwert	159	8811
Median	160	8317
Standardabweichung	52	2209
sTNF-RII-mRNA + Thio	172	13667
	422	11160
	673	15562
	350	14798
	408	13766
	373	11059
	175	9701
	209	18605
Mittelwert	348	13540
Median	362	13717
Standardabweichung	156	2691
7ND-mRNA + Thio	53	7408
	40	2797
	76	5642
	63	3353
	91	8023
	157	11147
	99	9758
	156	12358
Mittelwert	92	7561
Median	84	7716
Standardabweichung	41	3260

10.3 Bio-Plex-Analyse der Zytokinkonzentrationen

Etablierung Thioglykolat-induzierte Peritonitis

Tab. 46 Etablierung Thioglykolat-induzierte Peritonitis: Zytokinkonzentrationen im Lavageüberstand

Zytokine	Gruppe	Mittelwert [pg/ml]	Standardabweichung [pg/ml]
CCL2	Kontrolle	14,30	8,26
	Thioglykolat	5466,38	2136,92
IFN-γ	Kontrolle	0,00	0,00
	Thioglykolat	2,11	1,69
IL-1β	Kontrolle	0,00	0,00
	Thioglykolat	0,00	0,00
IL-6	Kontrolle	0,00	0,00
	Thioglykolat	1510,48	1046,43
IL-10	Kontrolle	7,15	14,31
	Thioglykolat	23,16	8,02
MIP-1α	Kontrolle	9,66	19,33
	Thioglykolat	62,71	40,53
MIP-1β	Kontrolle	46,51	93,03
	Thioglykolat	205,28	70,69
RANTES	Kontrolle	1,49	2,98
	Thioglykolat	9,54	2,90
TNF-α	Kontrolle	0,00	0,00
	Thioglykolat	10,84	10,81

Tab. 47 Etablierung Thioglykolat-induzierte Peritonitis: Zytokinkonzentrationen im Plasma

Zytokine	Gruppe	Mittelwert [pg/ml]	Standardabweichung [pg/ml]
CCL2	Kontrolle	25,74	27,41
	Thioglykolat	593,99	438,78
IFN-γ	Kontrolle	0,78	1,34
	Thioglykolat	1,04	2,11
IL-1β	Kontrolle	0,00	0,00
	Thioglykolat	0,00	0,00
IL-6	Kontrolle	3,48	4,33
	Thioglykolat	684,36	768,31
	Kontrolle	0,00	0,00

Anhang

IL-10	Thioglykolat	7,46	11,16
MIP-1α	Kontrolle	0,00	0,00
	Thioglykolat	6,59	4,40
MIP-1β	Kontrolle	20,19	34,96
	Thioglykolat	45,64	54,22
RANTES	Kontrolle	26,88	23,10
	Thioglykolat	18,07	20,71
TNF-α	Kontrolle	0,00	0,00
	Thioglykolat	8,37	13,34

Effektivität des zu testenden Viromer-7ND-mRNA-Komplexes

Intravenöse Applikation des Viromer-7ND-mRNA-Komplexes

Tab. 48 I.v.-Applikation des Viromer-7ND-mRNA-Komplexes: Zytokinkonzentrationen in Lavageüberständen

Zytokine	Gruppe	Mittelwert [pg/ml]	Standardabweichung [pg/ml]
CCL2	Unbehandelt	19,07	0,00
	PBS + Thio	3174,02	363,84
	7ND-mRNA + Thio	3002,13	1815,96
IFN-γ	Unbehandelt	0,00	0,00
	PBS + Thio	5,05	2,68
	7ND-mRNA + Thio	1,26	0,90
IL-1β	Unbehandelt	0,00	0,00
	PBS + Thio	2,30	3,25
	7ND-mRNA + Thio	0,00	0,00
IL-6	Unbehandelt	0,00	0,00
	PBS + Thio	1528,74	95,26
	7ND-mRNA + Thio	1239,51	370,71
IL-10	Unbehandelt	0,00	0,00
	PBS + Thio	48,69	9,72
	7ND-mRNA + Thio	46,24	12,27
MIP-1α	Unbehandelt	0,00	0,00
	PBS + Thio	37,94	1,58
	7ND-mRNA + Thio	50,99	22,76
MIP-1β	Unbehandelt	0,00	0,00
	PBS + Thio	193,81	121,73
	7ND-mRNA + Thio	240,73	97,10
RANTES	Unbehandelt	0,00	0,00
	PBS + Thio	5,13	3,64
	7ND-mRNA + Thio	1,37	1,94
TNF-α	Unbehandelt	0,00	0,00
	PBS + Thio	17,90	12,74
	7ND-mRNA + Thio	0,00	0,00

Tab. 49 I.v.-Applikation des Viromer-7ND-mRNA-Komplexes: Zytokinkonzentrationen im Plasma

Zytokine	Gruppe	Mittelwert [pg/ml]	Standardabweichung [pg/ml]
CCL2	Unbehandelt	0,00	0,00
	PBS + Thio	0,00	0,00
	7ND-mRNA + Thio	1396,68	1832,14
IFN-γ	Unbehandelt	0,00	0,00
	PBS + Thio	0,00	0,00
	7ND-mRNA + Thio	3,71	3,23
IL-1β	Unbehandelt	0,00	0,00
	PBS + Thio	0,00	0,00
	7ND-mRNA + Thio	0,00	0,00
IL-6	Unbehandelt	9,62	0,00
	PBS + Thio	151,30	16,82
	7ND-mRNA + Thio	224,66	29,43
IL-10	Unbehandelt	0,00	0,00
	PBS + Thio	30,71	10,35
	7ND-mRNA + Thio	51,75	20,85
MIP-1α	Unbehandelt	0,00	0,00
	PBS + Thio	0,00	0,00
	7ND-mRNA + Thio	16,61	18,25
MIP-1β	Unbehandelt	0,00	0,00
	PBS + Thio	0,00	0,00
	7ND-mRNA + Thio	25,52	36,09
RANTES	Unbehandelt	36,21	0,00
	PBS + Thio	61,21	16,96
	7ND-mRNA + Thio	37,91	29,95
TNF-α	Unbehandelt	141,41	0,00
	PBS + Thio	82,06	27,49
	7ND-mRNA + Thio	129,30	37,72

Reproduzierbarkeit der intravenösen Applikation des Viromer-7ND-mRNA-Komplexes**Tab. 50 Reproduzierbarkeit der i.v.-Applikation des Viromer-7ND-mRNA-Komplexes: Zytokinkonzentrationen im Lavageüberstand**

Zytokine	Gruppe	Mittelwert [pg/ml]	Standardabweichung [pg/ml]
CCL2	Unbehandelt	6113,84	716,21
	Viromer-Puffer + Thio	11046,79	4497,51
	7ND-mRNA + Thio	0,00	0,00
IFN-γ	Unbehandelt	3,58	0,00
	Viromer-Puffer + Thio	24,79	16,57
	7ND-mRNA + Thio	30,36	13,27
IL-1β	Unbehandelt	0,00	0,00
	Viromer-Puffer + Thio	13,17	3,19
	7ND-mRNA + Thio	18,24	5,37
IL-6	Unbehandelt	6,29	0,00
	Viromer-Puffer + Thio	1352,56	380,80
	7ND-mRNA + Thio	2974,17	1779,88
IL-10	Unbehandelt	0,00	0,00
	Viromer-Puffer + Thio	109,16	31,73
	7ND-mRNA + Thio	184,68	105,12
MIP-1α	Unbehandelt	0,00	0,00
	Viromer-Puffer + Thio	28,85	10,72
	7ND-mRNA + Thio	54,41	18,54
MIP-1β	Unbehandelt	6,67	0,00
	Viromer-Puffer + Thio	191,55	171,75
	7ND-mRNA + Thio	470,54	186,77
RANTES	Unbehandelt	0,00	0,00
	Viromer-Puffer + Thio	87,24	96,51
	7ND-mRNA + Thio	140,58	104,70
TNF-α	Unbehandelt	159,11	0,00
	Viromer-Puffer + Thio	180,03	29,98
	7ND-mRNA + Thio	155,02	51,49

Tab. 51 Reproduzierbarkeit der i.v.-Applikation des Viromer-7ND-mRNA-Komplexes: Zytokinkonzentrationen im Plasma

Zytokine	Gruppe	Mittelwert [pg/ml]	Standardabweichung [pg/ml]
CCL2	Unbehandelt	39,75	0,00
	Viromer-Puffer + Thio	567,18	397,94
	7ND-mRNA + Thio	872,56	524,08
IFN-γ	Unbehandelt	0,00	0,00
	Viromer-Puffer + Thio	0,00	0,00
	7ND-mRNA + Thio	1,85	3,21
IL-1β	Unbehandelt	0,00	0,00
	Viromer-Puffer + Thio	0,00	0,00
	7ND-mRNA + Thio	0,00	0,00
IL-6	Unbehandelt	0,00	0,00
	Viromer-Puffer + Thio	538,39	580,85
	7ND-mRNA + Thio	154,65	68,55
IL-10	Unbehandelt	0,00	0,00
	Viromer-Puffer + Thio	47,49	21,33
	7ND-mRNA + Thio	54,68	26,07
MIP-1α	Unbehandelt	0,00	0,00
	Viromer-Puffer + Thio	2,45	2,78
	7ND-mRNA + Thio	7,44	6,21
MIP-1β	Unbehandelt	0,00	0,00
	Viromer-Puffer + Thio	37,79	19,29
	7ND-mRNA + Thio	72,17	46,31
RANTES	Unbehandelt	24,44	0,00
	Viromer-Puffer + Thio	0,00	0,00
	7ND-mRNA + Thio	162,64	96,23
TNF-α	Unbehandelt	130,39	0,00
	Viromer-Puffer + Thio	154,40	17,00
	7ND-mRNA + Thio	162,41	54,94

Effektivität des Viomer-FLuc-mRNA-Komplexes

Tab. 52 Effektivität des Viomer-FLuc-mRNA-Komplexes: Zytokinkonzentrationen im Lavageüberstand

Zytokine	Gruppe	Mittelwert [pg/ml]	Standardabweichung [pg/ml]
CCL2	Viomer-Puffer + Thio	6482,33	347,33
	FLuc-mRNA + Thio	8127,98	664,74
IFN-γ	Viomer-Puffer + Thio	13,56	15,22
	FLuc-mRNA + Thio	21,97	18,77
IL-1β	Viomer-Puffer + Thio	4,61	0,00
	FLuc-mRNA + Thio	5,84	2,12
IL-6	Viomer-Puffer + Thio	1305,89	187,00
	FLuc-mRNA + Thio	2025,96	579,09
IL-10	Viomer-Puffer + Thio	53,63	5,23
	FLuc-mRNA + Thio	114,06	54,76
MIP-1α	Viomer-Puffer + Thio	23,30	7,29
	FLuc-mRNA + Thio	23,87	4,79
MIP-1β	Viomer-Puffer + Thio	171,16	35,61
	FLuc-mRNA + Thio	90,79	124,03
RANTES	Viomer-Puffer + Thio	63,30	62,42
	FLuc-mRNA + Thio	4,24	5,99
TNF-α	Viomer-Puffer + Thio	70,17	24,67
	FLuc-mRNA + Thio	81,60	38,36

Tab. 53 Effektivität des Viomer-FLuc-mRNA-Komplexes: Zytokinkonzentrationen im Plasma

Zytokine	Gruppe	Mittelwert [pg/ml]	Standardabweichung [pg/ml]
CCL2	Viomer-Puffer + Thio	285,76	61,71
	FLuc-mRNA + Thio	1461,98	835,79
IFN-γ	Viomer-Puffer + Thio	0,00	0,00
	FLuc-mRNA + Thio	0,00	0,00
IL-1β	Viomer-Puffer + Thio	0,00	0,00
	FLuc-mRNA + Thio	0,00	0,00
IL-6	Viomer-Puffer + Thio	207,96	37,65
	FLuc-mRNA + Thio	196,43	53,79
IL-10	Viomer-Puffer + Thio	33,06	3,73
	FLuc-mRNA + Thio	51,47	9,64
MIP-1α	Viomer-Puffer + Thio	0,00	0,00
	FLuc-mRNA + Thio	12,84	1,88
MIP-1β	Viomer-Puffer + Thio	18,75	2,33
	FLuc-mRNA + Thio	38,55	10,10
RANTES	Viomer-Puffer + Thio	52,31	1,34
	FLuc-mRNA + Thio	57,11	8,56
TNF-α	Viomer-Puffer + Thio	117,80	13,07
	FLuc-mRNA + Thio	114,22	15,85

Intraperitoneale Applikation des Viomer-7ND-mRNA-Komplexes

Tab. 54 I.p.-Applikation des Viomer-7ND-mRNA-Komplexes: Zytokinkonzentrationen im Lavageüberstand

Zytokine	Gruppe	Mittelwert [pg/ml]	Standardabweichung [pg/ml]
CCL2	Unbehandelt	32,40	0,00
	PBS + Thio	3162,50	47,43
	7ND-mRNA + Thio	6146,94	2614,76
IFN-γ	Unbehandelt	0,00	0,00
	PBS + Thio	1,11	1,57
	7ND-mRNA + Thio	0,00	0,00
IL-1β	Unbehandelt	0,00	0,00
	PBS + Thio	0,00	0,00
	7ND-mRNA + Thio	2,00	2,82
IL-6	Unbehandelt	0,00	0,00
	PBS + Thio	9,71	7,82
	7ND-mRNA + Thio	3346,87	1223,38
IL-10	Unbehandelt	0,00	0,00
	PBS + Thio	17,51	18,83
	7ND-mRNA + Thio	7,52	5,40
MIP-1α	Unbehandelt	0,00	0,00
	PBS + Thio	24,49	17,46
	7ND-mRNA + Thio	35,79	12,24
MIP-1β	Unbehandelt	0,00	0,00
	PBS + Thio	91,89	85,00
	7ND-mRNA + Thio	184,10	120,57
RANTES	Unbehandelt	0,00	0,00
	PBS + Thio	1,52	2,15
	7ND-mRNA + Thio	2,88	4,07
TNF-α	Unbehandelt	0,00	0,00
	PBS + Thio	8,95	12,66
	7ND-mRNA + Thio	0,00	0,00

Tab. 55 I.p.-Applikation des Viromer-7ND-mRNA-Komplexes: Zytokinkonzentrationen im Plasma

Zytokine	Gruppe	Mittelwert [pg/ml]	Standardabweichung [pg/ml]
CCL2	Unbehandelt	0,00	0,00
	PBS + Thio	0,00	0,00
	7ND-mRNA + Thio	577,68	194,49
IFN-γ	Unbehandelt	0,00	0,00
	PBS + Thio	1,89	1,89
	7ND-mRNA + Thio	11,00	4,31
IL-1β	Unbehandelt	0,00	0,00
	PBS + Thio	0,00	0,00
	7ND-mRNA + Thio	0,00	0,00
IL-6	Unbehandelt	0,00	0,00
	PBS + Thio	141,70	106,11
	7ND-mRNA + Thio	713,36	261,47
IL-10	Unbehandelt	0,00	0,00
	PBS + Thio	7,25	10,25
	7ND-mRNA + Thio	19,50	1,58
MIP-1α	Unbehandelt	0,00	0,00
	PBS + Thio	0,64	0,91
	7ND-mRNA + Thio	5,24	0,73
MIP-1β	Unbehandelt	0,00	0,00
	PBS + Thio	0,00	0,00
	7ND-mRNA + Thio	24,10	7,90
RANTES	Unbehandelt	0,00	0,00
	PBS + Thio	20,52	4,22
	7ND-mRNA + Thio	0,00	0,00
TNF-α	Unbehandelt	25,37	0,00
	PBS + Thio	79,39	14,17
	7ND-mRNA + Thio	130,12	27,98

Effektivität des zu testenden Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes im Modell der Thioglykolat-induzierten Peritonitis

Intravenöse Applikation des Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes

Tab. 56 I.v.-Applikation des Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes: Zytokinkonzentrationen im Lavageüberstand

Zytokine	Gruppe	Mittelwert [pg/ml]	Standardabweichung [pg/ml]
CCL2	Unbehandelt	0,00	0,00
	Viomer-Puffer + Thio	7849,51	1229,17
	sTNF-RII-mRNA + Thio	12511,25	2932,29
IFN-γ	Unbehandelt	0,00	0,00
	Viomer-Puffer + Thio	12,31	10,77
	sTNF-RII-mRNA + Thio	18,12	18,72
IL-1β	Unbehandelt	0,00	0,00
	Viomer-Puffer + Thio	9,23	2,37
	sTNF-RII-mRNA + Thio	6,54	4,33
IL-6	Unbehandelt	0,00	0,00
	Viomer-Puffer + Thio	1428,70	440,65
	sTNF-RII-mRNA + Thio	1818,10	859,11
IL-10	Unbehandelt	0,00	0,00
	Viomer-Puffer + Thio	100,39	16,53
	sTNF-RII-mRNA + Thio	75,41	33,56
MIP-1α	Unbehandelt	0,00	0,00
	Viomer-Puffer + Thio	31,72	9,95
	sTNF-RII-mRNA + Thio	28,73	16,14
MIP-1β	Unbehandelt	0,00	0,00
	Viomer-Puffer + Thio	148,15	145,81
	sTNF-RII-mRNA + Thio	328,62	247,95
RANTES	Unbehandelt	0,00	0,00
	Viomer-Puffer + Thio	12,00	12,60
	sTNF-RII-mRNA + Thio	59,39	26,76
TNF-α	Unbehandelt	121,12	0,00
	Viomer-Puffer + Thio	121,11	40,34
	sTNF-RII-mRNA + Thio	105,21	6,64

Tab. 57 I.v.-Applikation des Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes: Zytokinkonzentrationen im Plasma

Zytokine	Gruppe	Mittelwert [pg/ml]	Standardabweichung [pg/ml]
CCL2	Unbehandelt	39,75	0,00
	Viomer-Puffer + Thio	298,56	60,33
	sTNF-RII-mRNA + Thio	6122,83	1439,32
IFN-γ	Unbehandelt	17,74	0,00
	Viomer-Puffer + Thio	0,00	0,00
	sTNF-RII-mRNA + Thio	3,41	3,43
IL-1β	Unbehandelt	0,00	0,00
	Viomer-Puffer + Thio	0,00	0,00
	sTNF-RII-mRNA + Thio	0,00	0,00
IL-6	Unbehandelt	0,00	0,00
	Viomer-Puffer + Thio	132,01	31,30
	sTNF-RII-mRNA + Thio	149,18	41,50
IL-10	Unbehandelt	0,00	0,00
	Viomer-Puffer + Thio	33,11	5,56
	sTNF-RII-mRNA + Thio	96,79	19,63
MIP-1α	Unbehandelt	0,00	0,00
	Viomer-Puffer + Thio	0,00	0,00
	sTNF-RII-mRNA + Thio	36,40	5,53
MIP-1β	Unbehandelt	15,48	0,00
	Viomer-Puffer + Thio	24,19	9,70
	sTNF-RII-mRNA + Thio	197,44	45,44
RANTES	Unbehandelt	0,00	0,00
	Viomer-Puffer + Thio	27,84	7,61
	sTNF-RII-mRNA + Thio	317,22	150,01
TNF-α	Unbehandelt	108,80	0,00
	Viomer-Puffer + Thio	170,51	47,86
	sTNF-RII-mRNA + Thio	197,02	56,59

Reproduzierbarkeit der intravenösen Applikation des Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes**Tab. 58 Reproduzierbarkeit der i.v.-Applikation des Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes: Zytokinkonzentrationen im Lavageüberstand**

Zytokine	Gruppe	Mittelwert [pg/ml]	Standardabweichung [pg/ml]
CCL2	Viomer-Puffer + Thio	6482,33	347,33
	sTNF-RII-mRNA + Thio	14514,66	992,04
IFN-γ	Viomer-Puffer + Thio	13,56	15,22
	sTNF-RII-mRNA + Thio	49,02	62,64
IL-1β	Viomer-Puffer + Thio	4,61	0,00
	sTNF-RII-mRNA + Thio	6,81	3,36
IL-6	Viomer-Puffer + Thio	1305,89	187,00
	sTNF-RII-mRNA + Thio	2335,20	368,18
IL-10	Viomer-Puffer + Thio	53,63	5,23
	sTNF-RII-mRNA + Thio	81,27	20,68
MIP-1α	Viomer-Puffer + Thio	23,30	7,29
	sTNF-RII-mRNA + Thio	34,08	14,70
MIP-1β	Viomer-Puffer + Thio	171,16	35,61
	sTNF-RII-mRNA + Thio	315,73	60,99
RANTES	Viomer-Puffer + Thio	63,30	62,42
	sTNF-RII-mRNA + Thio	174,16	18,55
TNF-α	Viomer-Puffer + Thio	70,17	24,67
	sTNF-RII-mRNA + Thio	72,85	29,62

Tab. 59 Reproduzierbarkeit der i.v.-Applikation des Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes: Zytokinkonzentrationen im Plasma

Zytokine	Gruppe	Mittelwert [pg/ml]	Standardabweichung [pg/ml]
CCL2	Viomer-Puffer + Thio	285,76	61,71
	sTNF-RII-mRNA + Thio	5825,32	885,04
IFN-γ	Viomer-Puffer + Thio	0,00	0,00
	sTNF-RII-mRNA + Thio	2,47	3,49
IL-1β	Viomer-Puffer + Thio	0,00	0,00
	sTNF-RII-mRNA + Thio	0,00	0,00
IL-6	Viomer-Puffer + Thio	207,96	37,65
	sTNF-RII-mRNA + Thio	208,95	35,60
IL-10	Viomer-Puffer + Thio	33,06	3,73
	sTNF-RII-mRNA + Thio	112,95	15,16
MIP-1α	Viomer-Puffer + Thio	0,00	0,00
	sTNF-RII-mRNA + Thio	41,68	4,27
MIP-1β	Viomer-Puffer + Thio	18,75	2,33
	sTNF-RII-mRNA + Thio	184,99	39,83
RANTES	Viomer-Puffer + Thio	52,31	1,34
	sTNF-RII-mRNA + Thio	619,94	53,42
TNF-α	Viomer-Puffer + Thio	117,80	13,07
	sTNF-RII-mRNA + Thio	244,31	37,41

Intraperitoneale Applikation des Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes**Tab. 60 I.p.-Applikation des Viomer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes: Zytokinkonzentrationen im Lavageüberstand**

Zytokine	Gruppe	Mittelwert [pg/ml]	Standardabweichung [pg/ml]
CCL2	Unbehandelt	32,40	0,00
	PBS + Thio	3162,50	47,43
	sTNF-RII-mRNA + Thio	6734,27	842
IFN-γ	Unbehandelt	0,00	0,00
	PBS + Thio	1,11	1,57
	sTNF-RII-mRNA + Thio	0,89	1,26
IL-1β	Unbehandelt	0,00	0,00
	PBS + Thio	0,00	0,00
	sTNF-RII-mRNA + Thio	6,56	1,13
IL-6	Unbehandelt	0,00	0,00
	PBS + Thio	9,71	7,82
	sTNF-RII-mRNA + Thio	5128,56	559,61
IL-10	Unbehandelt	0,00	0,00
	PBS + Thio	17,51	18,83
	sTNF-RII-mRNA + Thio	5,77	4,10
MIP-1α	Unbehandelt	0,00	0,00
	PBS + Thio	24,49	17,46
	sTNF-RII-mRNA + Thio	42,20	8,47
MIP-1β	Unbehandelt	0,00	0,00
	PBS + Thio	91,89	85,00
	sTNF-RII-mRNA + Thio	262,10	57,66
RANTES	Unbehandelt	0,00	0,00
	PBS + Thio	1,52	2,15
	sTNF-RII-mRNA + Thio	0,00	0,00
TNF-α	Unbehandelt	0,00	0,00
	PBS + Thio	8,95	12,66
	sTNF-RII-mRNA + Thio	0,00	0,00

Tab. 61 I.p.-Applikation des Viromer-sTNF-RII-mRNA-Komplexes: Zytokinkonzentrationen im Plasma

Zytokine	Gruppe	Mittelwert [pg/ml]	Standardabweichung [pg/ml]
CCL2	Unbehandelt	0,00	0,00
	PBS + Thio	0,00	0,00
	sTNF-RII-mRNA + Thio	550,51	163,57
IFN-γ	Unbehandelt	0,00	0,00
	PBS + Thio	1,89	1,89
	sTNF-RII-mRNA + Thio	2,29	3,23
IL-1β	Unbehandelt	0,00	0,00
	PBS + Thio	0,00	0,00
	sTNF-RII-mRNA + Thio	0,00	0,00
IL-6	Unbehandelt	0,00	0,00
	PBS + Thio	141,70	106,11
	sTNF-RII-mRNA + Thio	997,55	312,28
IL-10	Unbehandelt	0,00	0,00
	PBS + Thio	7,25	10,25
	sTNF-RII-mRNA + Thio	14,49	10,33
MIP-1α	Unbehandelt	0,00	0,00
	PBS + Thio	0,64	0,91
	sTNF-RII-mRNA + Thio	5,48	1,63
MIP-1β	Unbehandelt	0,00	0,00
	PBS + Thio	0,00	0,00
	sTNF-RII-mRNA + Thio	26,11	18,62
RANTES	Unbehandelt	0,00	0,00
	PBS + Thio	20,52	4,22
	sTNF-RII-mRNA + Thio	9,44	8,47
TNF-α	Unbehandelt	25,37	0,00
	PBS + Thio	79,39	14,17
	sTNF-RII-mRNA + Thio	173,85	85,36

Zusammenfassender Versuch zur intravenösen Applikation des Viomer-7ND/sTNF-RII-mRNA-Komplex

Tab. 62 Effektivität des Viomer-7ND- bzw. -sTNF-RII-mRNA-Komplexes: Zytokinkonzentrationen im Lavageüberstand

Zytokine	Gruppe	Mittelwert [pg/ml]	Standardabweichung [pg/ml]
CCL2	Viomer-Puffer + Thio	5237,96	802,44
	sTNF-RII-mRNA + Thio	8753,13	2218,50
	7ND-mRNA + Thio	12094,88	2377,06
IFN-γ	Viomer-Puffer + Thio	26,22	4,31
	sTNF-RII-mRNA + Thio	31,07	2,03
	7ND-mRNA + Thio	33,46	2,61
IL-1β	Viomer-Puffer + Thio	20,46	3,17
	sTNF-RII-mRNA + Thio	17,31	2,15
	7ND-mRNA + Thio	17,73	2,42
IL-6	Viomer-Puffer + Thio	1380,28	199,23
	sTNF-RII-mRNA + Thio	1370,36	876,42
	7ND-mRNA + Thio	1545,19	776,30
IL-10	Viomer-Puffer + Thio	92,00	6,85
	sTNF-RII-mRNA + Thio	61,90	31,05
	7ND-mRNA + Thio	89,17	20,23
MIP-1α	Viomer-Puffer + Thio	33,99	8,82
	sTNF-RII-mRNA + Thio	29,11	10,16
	7ND-mRNA + Thio	38,20	17,22
MIP-1β	Viomer-Puffer + Thio	186,53	128,30
	sTNF-RII-mRNA + Thio	148,17	107,86
	7ND-mRNA + Thio	81,73	104,43
RANTES	Viomer-Puffer + Thio	87,04	57,64
	sTNF-RII-mRNA + Thio	106,34	115,86
	7ND-mRNA + Thio	233,08	125,65
TNF-α	Viomer-Puffer + Thio	151,14	33,50
	sTNF-RII-mRNA + Thio	84,77	45,69
	7ND-mRNA + Thio	259,03	302,43

Tab. 63 Effektivität des Viromer-7ND- bzw. des -sTNF-RII-mRNA-Komplexes: Zytokinkonzentrationen im Plasma

Zytokine	Gruppe	Mittelwert [pg/ml]	Standardabweichung [pg/ml]
CCL2	Viromer-Puffer + Thio	347,66	53,70
	sTNF-RII-mRNA + Thio	5508,00	1940,14
	7ND-mRNA + Thio	9751,54	3823,33
IFN-γ	Viromer-Puffer + Thio	18,81	3,72
	sTNF-RII-mRNA + Thio	90,31	188,47
	7ND-mRNA + Thio	123,91	201,99
IL-1β	Viromer-Puffer + Thio	25,05	2,97
	sTNF-RII-mRNA + Thio	26,14	1,53
	7ND-mRNA + Thio	25,14	1,18
IL-6	Viromer-Puffer + Thio	131,25	38,00
	sTNF-RII-mRNA + Thio	154,52	33,75
	7ND-mRNA + Thio	250,99	142,64
IL-10	Viromer-Puffer + Thio	70,79	9,78
	sTNF-RII-mRNA + Thio	190,76	25,74
	7ND-mRNA + Thio	190,91	42,48
MIP-1α	Viromer-Puffer + Thio	12,31	2,04
	sTNF-RII-mRNA + Thio	41,25	7,41
	7ND-mRNA + Thio	47,17	3,59
MIP-1β	Viromer-Puffer + Thio	101,21	105,50
	sTNF-RII-mRNA + Thio	287,94	75,35
	7ND-mRNA + Thio	358,96	62,91
RANTES	Viromer-Puffer + Thio	100,79	11,38
	sTNF-RII-mRNA + Thio	386,51	112,98
	7ND-mRNA + Thio	1065,89	162,29
TNF-α	Viromer-Puffer + Thio	285,33	90,52
	sTNF-RII-mRNA + Thio	298,23	31,24
	7ND-mRNA + Thio	260,33	43,29